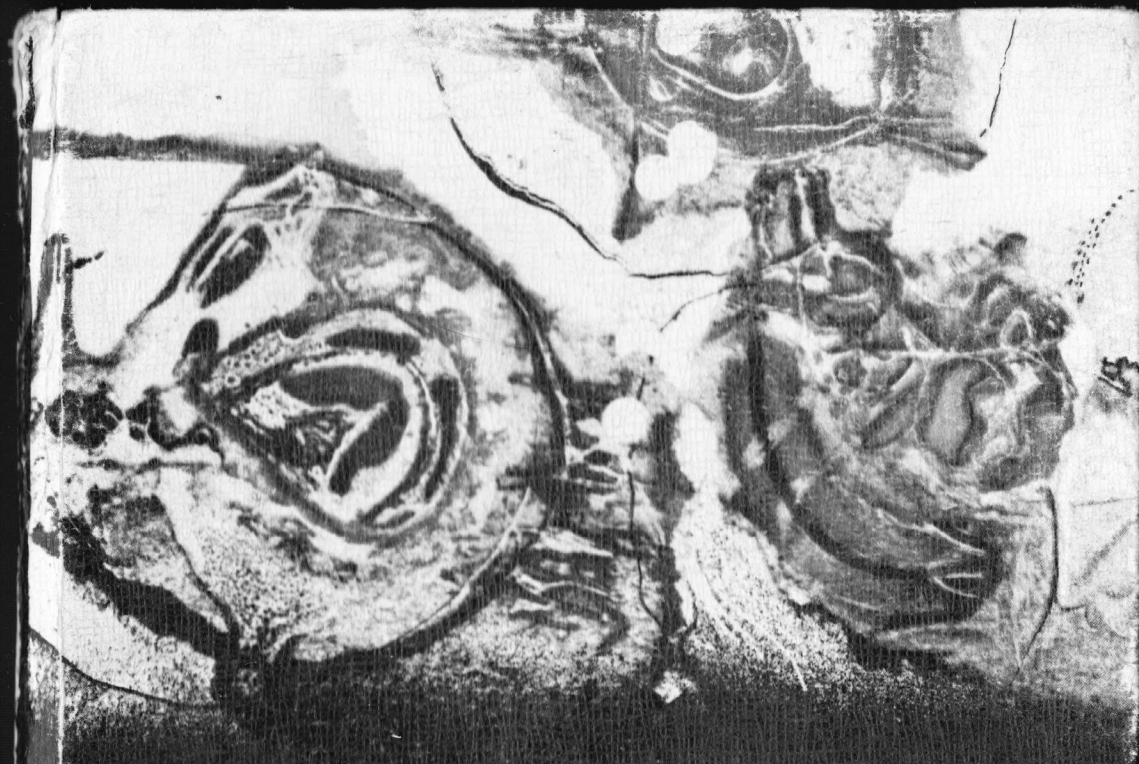


lucian gavrilă • ion dăbală

genetica diviziunii celulare

PREFAȚA

Marile descoperiri ale biologiei le datorăm secolelor XIX și XX. Dacă secolul al XIX-lea ne-a oferit, prin mintea genială a lui Darwin, tezele generale ale complicatului fenomen de evoluție biologică, secolul al XX-lea ne-a adus în lumina cunoașterii, adîncimile, aprofundările, detaliile, căile intime prin care se realizează el. Secolul al XIX-lea ne-a arătat grandoarea și mirajul pădurii, secolul al XX-lea ne arată frumusețea și arhitectura fiecărui copac.

Spirala dialectică a cunoașterii biologice a atins în mersul său puncte nebănuite de cei mai mari vizionari ai biologiei secolului trecut. Astăzi, fenomenul evoluției biologice este conceput în condițiile în care se cunoaște ce rol joacă acizii nucleici în codificarea și transmiterea informației genetice, cum se realizează reglajul genetic, care este raportul cauzal între necesitate și întîmplare, în sfera biologicului. Cercetări de mare finețe, datorate lui J. Backwith, de la universitatea Harvard, au pus capăt disputei în jurul genei, silind-o pe aceasta să se dezvăluie ca unitate chimică de bază a eredității. Pentru prima dată în istoria biologiei o genă a fost izolată din cromozomul bacterian, spre uimirea poate chiar a aceluia care a realizat acest lucru.

În 1970, O. Miller și Ch. Thomas au surprins gena bacteriană „la lucru": un lanț de poliribozomi atașat de cromozomul circular bacterian (ADN-ul bacterian) ce copia informația genetică și realiza pe baza ei sinteze de proteine specifice. Mai mult, cercetările au mers pînă acolo încît s-au reușit sinteze artificiale de diferite tipuri de virusuri. Nu este departe timpul cînd „viața creată în eprubetă" se va transforma din metaforă în realitate.

Fenomenele biologice sînt de mare complexitate și de nespusă frumusețe. Dar unul dintre cele mai interesante, spectaculoase și captivante fenomene biologice este cel al diviziunii celulare. Pentru multe organisme, mai ales cele unicelulare, diviziunea este modul curent de reproducere.

Reproducerea înseamnă elaborarea unui program identic cu acela care a existat în generația anterioară. Din generație în generație, folosind drept cale de transmisie calea genetică, se transmit instrucțiunile, planurile arhitecturale ale viitorului organism. F. Jacob, laureat al premiului Nobel, arată că „într-o ființă vie totul este rînduit în

vederea reproducerii ... nu există azi pe Pămînt ființe vii decît în măsura în care aceste ființe s-au reprodus cu îndîrjire timp de două miliarde de ani sau mai mult". Pentru sistemele biologice reproducerea constituie însăși cauza existenței lor; sistemul biologic ori se reproduce ori dispare. Cale de mijloc nu există. Prin reproducerea sistemelor biologice, lumea vie evoluează, în sensul opus lumii lipsite de viață, realizînd o ordine crescîndă, opunîndu-se aparentei dezordini a lumii lipsite de viață.

Diviziunea celulară, un mecanism biologic fundamental, prin care se asigură continuitatea sistemului biologic în timp și reproducerea programului acestui sistem de-a lungul generațiilor celulare, este unul dintre cele mai interesante fenomene întîlnite în natură. În același timp, contrar aparențelor, este un fenomen extrem de complicat și multe din laturile sale, oricît de mult se cunoaște despre el, mai țin de domeniul ipotezelor și incertitudinilor. Deși descoperit de aproape un secol și jumătate, fenomenul diviziunii celulare preocupă cu același interes gîndirea biologilor și multe laboratoare din lume și-au înscris în programul lor de lucru studiul aprofundat, sub multiple laturi, al diviziunii celulare. Biochimia, biofizica, cibernetica, matematica se alătură datelor de citologie, citogenetică în explicarea fenomenului diviziunii celulare. Deși organizarea genetică prezintă multe scheme, de la organizarea procariotă la aceea mezocariotă și, în sfîrșit, organizarea eucariotă, în linii generale, mecanismul diviziunii celulare, mai ales la nivelul molecular, prezintă, în cadrul acestor variate tipuri de organizare genetică, o uimitoare similitudine. Marile deosebiri apar însă la nivel supramolecular, în defășurarea evenimentelor distributive ale diviziunii celulare, care se prezintă într-o gamă destul de variată chiar în cadrul aceluiași tip de organizare genetică. Surprinzător este însă faptul că pe căi diferite se ajunge la același rezultat: repartizarea cît mai echilibrată a produșilor de replicație în celulele fiice, restabilirea integralității programului acestora în conformitate cu programul celulei inițiale.

Diviziunea celulară apare ca un fenomen de deosebită importanță în viața organismelor, asigurînd continuitatea programului sistemelor biologice de-a lungul unor perioade mari de timp, uneori extraordinar de mari, de mărimea erelor geologice sau chiar de durata vieții organice.

Evoluția organizării genetice, a structurii cromozomului, a pornit de la forme primordiale, specifice structurii procariote, ce caracterizează bacteriile, actinomicetele și algele albastre, la care lipsește un nucleu propriu-zis, iar genele iau contact direct cu citoplasma în lipsa unei membrane nucleare, trecînd de la forme cu centromeri

difuzi ce caracterizează unele alge și unele plante superioare primitive, la care funcția centromerică nu este bine localizată, ajungînd la organisme cu centromer localizat dar cu număr mare de constricții secundare, așa cum sînt unele monocotiledonate primitive și, în sfîrșit, la formele cu un singur centromer, cu o singură constricție secundară și cu cîteva segmente heterocromatice. Aceste tipuri de organizare genetică coexistă astăzi, iar diviziunea celulară în cadrul lor se realizează în linii mari după un plan comun, în care are loc o succesiune regulată între procesele replicative și acelea distributive.

Ridicîndu-se problema originii structurilor superior organizate din structuri primare a fost elaborată, în ultimul timp, ipoteza originii endosimbiotice a celulelor eucariote, o ipoteză interesantă, care are unele puncte de sprijin destul de bine consolidate.

Studiul diviziunii celulare constituie o permanentă preocupare pentru mulți biologi deoarece acest fenomen prezintă semnificații majore în desfășurarea programului sistemului biologic normal. Desfășurarea normală a diviziunii celulare este un indiciu că sistemul biologic se află în condiții ecologice normale. Dimpotrivă, apariția de anomalii în desfășurarea diviziunii celulare reflectă tulburarea condițiilor interne și externe ale sistemului biologic, cu implicații imediate în supraviețuirea sa.

Date fiind multiplele semnificații de ordin biologic general și de ordin genetic în special ale fenomenului diviziunii celulare am conceput această carte cu gîndul de a prezenta într-o măsură cît mai completă stadiul cercetărilor pe plan mondial și național în acest domeniu. Bazați deopotrivă pe consultarea unui număr cît mai mare de lucrări științifice, tratate și monografii și pe experiența personală în acest domeniu, am crezut de cuviință că ar fi util să prezentăm cititorilor modalitățile de desfășurare a diviziunii în cadrul diferitelor trepte de organizare genetică. Ne-am referit pe scurt la mecanismul reproducerii în cadrul virusurilor, deși acest grup, în general, nu este acceptat ca fiind alcătuit din sisteme biologice. Lwoff a afirmat că „virusurile trebuie să le considerăm virusuri pentru că sînt virusuri", vrînd să arate cu această butadă statutul aparte al acestora. Dar faptul că virusurile au o reproducere a lor (și noi știm că reproducerea reprezintă în fond finalitatea oricărui sistem biologic) desfășurată, e drept, după particularități cu totul străine celorlalte sisteme biologice, ne-a determinat să ne oprim și asupra acestui grup pentru a prezenta cititorului o imagine generală asupra fenomenelor reproductive din lumea vie.

În continuare se analizează organizarea și mecanismul diviziunii celulare în cadrul organizării procariote, mezocariote și eucariote,

prezentîndu-se particularităţile diviziunii la bacterii, alge albastre, dinoficee şi la organismele eucariote plante şi animale. Din această expunere sperăm să fi reieşit clar pentru cititor, că indiferent de modalităţile prin care se realizează diviziunea celulară, aceasta duce, în cadrul diferitelor categorii de organisme, la reproducerea sistemelor biologice şi mai ales la asigurarea continuităţii programului genetic de-a lungul generaţiilor.

O atenţie deosebită a fost acordată meiozei, prezentîndu-se particularităţile acesteia la diverse grupe de organisme. Sînt expuse datele recente de microscopie electronică care au dus la evidenţierea complexului sinaptinemal — rezultat al conjugării cromozomilor.

Replicarea materialului genetic, atît în cadrul ciclului mitotic cît şi în cadrul ciclului meiotic, este analizată în detaliu, folosindu-se datele recente de microscopie electronică şi autoradiografie.

Structura cromozomului, comportamentul său mitotic şi meiotic sînt analizate în detaliu.

În partea finală sînt expuse date referitoare la influenţa agenţilor fizici, chimici şi biologici asupra desfăşurării diviziunii celulare.

Cartea se adresează tuturor acelora care sînt interesaţi de fenomenele genetice la nivel celular, geneticienilor în primul rînd, diverşilor specialişti: biologi, medici, agronomi, studenţi, profesori de biologie, chiar şi elevilor. Desigur, sarcina realizării unei asemenea monografii a fost extrem de deficilă. Dar întrucît, la noi în ţară nu a apărut o asemenea monografie, iar tratatele străine, dealtfel greu accesibile nu mai corespund întru totul noilor date ale microscopiei electronice şi autoradiografiei, se impunea realizarea sa.

Sîntem îndatoraţi referenţilor ştiinţifici pentru sugestiile făcute, aducîndu-le pe această cale sincere mulţumiri.

Deoarece considerăm că această carte este susceptibilă de îmbunătăţiri în vederea unei viitoare ediţii, sîntem deosebit de recunoscători tuturor acelora care prin sugestii şi recomandări vor contribui la desăvîrşirea sa.

Bucureşti, Cluj-Napoca, septembrie 1974

CUPRINS

Prefaţa 5

Cap. I. **Introducere** 11

Cap. II. **Cromozomul — Structură şi morfologie** 17
1. *Structura optică şi electronmicroscopică a cromozomului eucariotelor* 17
2. *Structura genoforului bacterian şi a cromozomului dinoflagelatelor comparativ cu aceea a cromozomului eucariotic* 31
3. *Morfologia cromozomilor* 38
4. *Cromozomul organizator nucleolar* 50

Cap. III. **Biochimia cromozomului** 56
1. *Compoziţia chimică a cromatinei* 56
2. *Arhitectura moleculară a cromozomului* 59
3. *Specializarea funcţională a cromatinei: eucromatina şi heterocromatina* 65
4. *Rolul histonelor în structura şi funcţia cromatinei* 74

Cap. IV. **Replicarea cromozomului** 76

Cap. V. **Particularităţile multiplicării formelor precelulare (acelulare) de viaţă** 93

Cap. VI. **Organizarea genetică procariotă şi modalităţile de replicare şi diviziune** 103
A. *Bacterii* 105
B. *Alge albastre (Cyanophyceae)* 114
C. *Problema trecerii de la structura procariotă la structura eucariotă* 118

Cap. VII. **Particularităţile de organizare şi mecanismul diviziunii la organismele mezocariote** 124

Cap. VIII. **Organizarea genetică eucariotă** 130
1. *Introducere* 130
2. *Ciclul celular la eucariote* 133
a). Ciclul mitotic 133
b) Ciclul meiotic 139
c) Trecerea de la ciclul mitotic la ciclul meiotic 145

Cap. IX. **Ciclul celular** 148
A. *Diviziunea mitotică* 148
1. Semnificaţia biologică a mitozei 148
2. Cinetica diviziunii celulare 150
a) Interfaza 150

b) Profaza 153
c) Metafaza 160
d) Anafaza 162
e) Telofaza 165
f) Citochineza 167
3. Energetica diviziunii celulare 168
B. Tipuri particulare de diviziune nucleară 170
1. Amitoza 171
2. Pleuromitoza, criptomitoza, criptopleuromitoza 171
3. Mitoza euglenoidă 176
4. Diviziunea nucleară la ciliate 179
5. Endomitoza și politenia 183
C. Meioza 185
1. *Desfășurarea meiozei* 191
a) *Prima diviziune meiotică* 191
b) *A doua diviziune meiotică* 218
2. *Modificări în desfășurarea normală a meiozei și mecanismele lor genetice* 222
3. *Meioza în condițiile variației numărului de cromozomi* 226
a) Desfășurarea meiozei la organismele haploide 227
b) Desfășurarea meiozei la formele poliploide 229
Cap. X. **Influența factorilor mutageni asupra diviziunii celulare** 252
1. *Factori fizici — radiații ionizante* 252
2. *Factori chimici mutageni* 263
3. *Influența factorilor biologici* 278
Cap. XI. **Reglarea diviziunii celulare** 284
Cap. XII. **Concluzii generale** 290
Organizarea genetică în lumea vie 290
Organizarea genetică procariotă 290
Organizarea genetică eucariotă 295
Structura moleculară a cromozomului eucariotic 299
Organizarea genetică mezocariotă 304
Bibliografie 307

Capitolul I.

INTRODUCERE

Celula este unitate de structură și funcție pentru metafite și metazoare. Ea poate exista liber, reprezentînd indivizi biologici (sisteme biologice de nivel individual) în cazul organismelor unicelulare protozoare sau protofite sau intră în alcătuirea țesuturilor ca subansambluri (subsisteme) la metafite și metazoare. În ambele cazuri, celula reprezintă fundamentul vieții avînd ca principale componente citoplasma și nucleul. Citoplasma sau protoplasma include formațiuni infracitoplasmatice precum mitocondriile, dictiozomii (aparatul Golgi), ribozomii, reticulul endoplasmatic, centrozomii, centriolele, plastidele etc., și este înconjurată de o membrană plasmatică, subțire și fină la celulele animale, rigidă și groasă la celulele vegetale (Fig. 1). Toate aceste organite celulare care se întîlnesc doar în celulele eucaricte (cu nucleu bine individualizat, delimitat de o membrană nucleară dublă, electronoptic) îndeplinesc funcții specifice în cadrul metabolismului celular. Astfel, mitocondriile sau condriozomii sînt corpuscule granulare rotunde sau baghetiforme ce posedă însușirea autoreplicării și reprezintă sediul reacțiilor oxido-reducătoare fiind deci specializate în îndeplinirea funcțiilor energetice ale celulei. Ribozomii sînt granule sferice alcătuite din acid ribonucleic (în esență ARN-ribozomal) și care constituie sediul sintezei proteice. Ei se pot fixa pe reticulul endoplasmatic (un sistem de canalicule și cisterne membranare intracitoplasmatice, care asigură stabilirea de legături între diferite compartimente celulare) (Fig. 2). Aparatul lui Golgi, sau dictiozomii, reprezintă un complex lamelar și vezicular de natură lipoidică cu rol în depozitarea substanțelor sintetizate în celulă și în maturarea produșilor de sinteză.

Centrozomii sînt doi corpusculi mici care participă la formarea fusului de diviziune reprezentînd centrul activității mitotice. Centriolul reprezintă o granulă centrală, la celulele animale, care stimulează activitatea centrozomului, divizîndu-se anterior diviziunii acestuia.

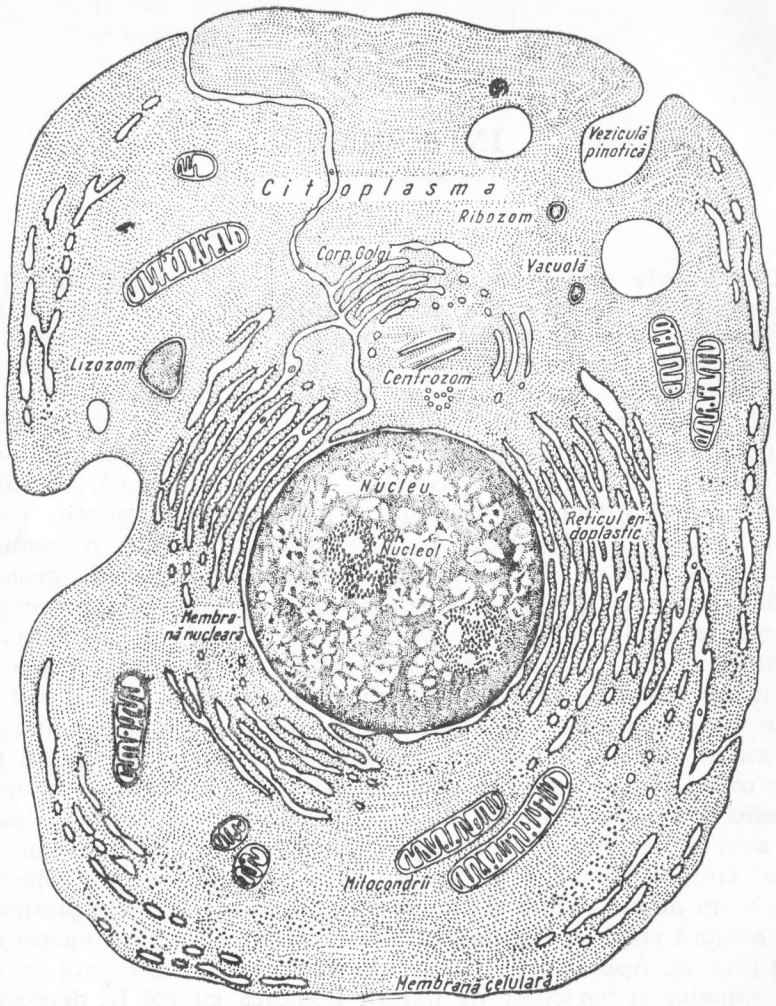


Fig. 1 — *Diagrama modernă a celulei eucariote tipice* (după *J. Brachet*, 1961).

Plastidele reprezintă prin cloroplaste organite intracitoplasmatice din celulele vegetale, cu rol în asigurarea funcției de fotosinteză. Mai sînt și alte categorii de plastide. Ca și mitocondriile ele au un ADN propriu și un sistem de sinteză proteică relativ independent de sistemul citoplasmatic.

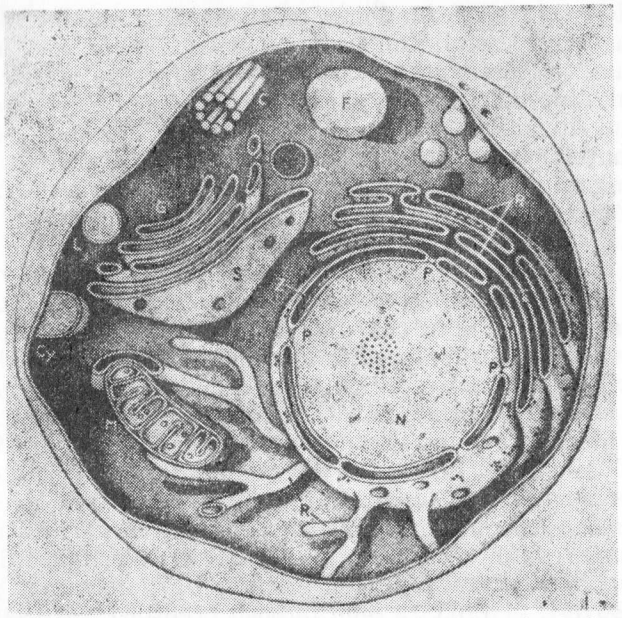


Fig. 2 — *Modelul spațial secționat al unei celule animale fără reprezentarea hialoplasmei.* *C* — centrozom; *Cy* — citozom; *E* — ergastoplasmă organizată; *F* — particule de grăsime; *G* — aparat Golgi; *L* — lizozom; *M* — mitocondrii; *N* — nucleu; *P* — pori nucleari; *Pi* — pinocitoză; *R* — reticul; *S* — sacul aparținînd aparatului Golgi (dictiozom); *Z* — membrană nucleară (cisternă perinucleară), (după G. C. Hirsch, 1973).

Nucleul celular reprezintă un organit a cărui substanță de bază este reprezentată de un complex nucleoproteic (asociere de acid dezoxiribonucleic — ADN — și proteine bazice de tip histonă) pe lîngă care se mai întîlnește ARN (acid ribonucleic) proteine acide, enzime, lipide, ioni de Ca, Mg, Cu etc. Conținînd cea mai mare cantitate din ADN-ul celular, nucleul este implicat în fenomenele ereditare, la nivelul ADN-ului fiind localizate genele. Încă de la sfîrșitul secolului al XIX-lea, Haeckel și Weismann au legat fenomenele ereditare de nucleu.

Nucleul la eucariote este înconjurat de o membrană nucleară care-l separă de citoplasmă. Din loc în loc, membrana nucleară prezintă pori, astfel încît se asigură o permanentă legătură între nucleu și citoplasmă. De fapt, membrana nucleară reprezintă o parte a reticulului endoplasmatic. Nucleul prezintă deci o membrană

nucleară și o substanță fundamentală numită carioplasma. Fluidul nuclear s-a numit cariolimfa. În nucleul celular se află un organit dens și rotund — nucleolul — alcătuit din proteine și acizi nucleici, avînd rol în sinteza ARN-ului și proteinelor.

În timpul diviziunii, substanța cromatică — cromatina (denumire dată substanței nucleare din cauza afinității sale pentru coloranții bazici) — se organizează la nivelul unor elemente structurale, nucleoproteice, compacte, numite cromozomi, iar nucleul își pierde individualitatea.

Fiecare specie are un număr caracteristic și constant de cromozomi care își păstrează, în condiții normale, individualitatea de-a lungul generațiilor. Faptul că există o izbitoare asemănare între comportamentul factorilor ereditari mendelieni (aflați în dublă cantitate în celulele somatice, adică sub formă de pereche, și în doză simplă în celulele reproducătoare-gameți) și comportamentul cromozomilor în mitoză și meioză (se repartizează exact în două părți egale în celulele fiice, aflîndu-se în număr dublu în celulele somatice și în număr redus la jumătate în gameți — care au deci o garnitură haploidă de cromozomi —, astăzi se știe că în garnitura diploidă de cromozomi se află o cantitate dublă de ADN comparativ cu garnitura haploidă de cromozomi din gameți) l-a determinat pe Sutton în 1903 și Boveri, în 1905, să lege factorii ereditari, respectiv genele, de cromozomi, fundamentîndu-se astfel citogenetica.

Celula procariotelor este mult mai simplă. Ea este alcătuită dintr-o membrană citoplasmatică și citoplasmă — în care cele mai importante organite sînt reprezentate de ribozomi. Materialul genetic este reprezentat ca și la eucariote de ADN, dar acesta nu este complexat cu proteinele bazice histone. Mai mult, materialul genetic nu este separat față de citoplasmă printr-o membrană nucleară. El poate fi însă concentrat în mase compacte care s-au numit nucleoizi. De regulă, există un singur nucleoid per celulă. Toate funcțiile celulei procariote sînt îndeplinite de citoplasmă sau membrana citoplasmatică, celula procariotă fiind astfel un sinergon.

Pe baza datelor de citologie și de genetică, la începutul secolului al XX-lea, Morgan, Bridges, Müller și Sturtevant au elaborat teoria cromozomală a eredității potrivit căreia genele, care se prezintă în celulele somatice sub formă de pereche — de alele — sînt localizate pe cromozomi, în locuri precise numite loci. Ele sînt așezate liniar pe cromozomi. Genele plasate pe același cromozom se transmit în bloc, adică înlănțuit, la descendenți, și acest fenomen s-a numit lincaj. La Drosophila melanogaster, la care există în garnitura diploidă 8 cromozomi, sînt patru grupe de lincaj (cei 8 cromozomi sînt doi cîte doi omologi, cîte unul fiind de origine maternă

iar celălalt de origine paternă, formîndu-se astfel 4 perechi de cromozomi; fiecărei perechi de cromozomi îi corespunde o grupă de lincaj). La procariote, la care există un singur cromozom, de regulă circular, toate genele sînt strîns lincate, formînd un singur grup de lincaj. Morgan și colaboratorii au mai constatat că apar uneori, cu o anumită frecvență, și cazuri care se abat de la principiul transmiterii înlănțuite a genelor. Astfel, plecîndu-se de la genitori care prezentau caractere distinctive, se obțin în descendență pe lîngă tipurile parentale (datorită transmiterii înlănțuite a genelor) și indivizi care prezentau caractere recombinate (abatere de la transmiterea înlănțuită). Pentru a explica aceste cazuri, Morgan și colaboratorii au emis ipoteza crossing-overului potrivit căreia între cromozomii omologi, în meioză, se realizează un schimb reciproc de fragmente, respectiv de gene.

În 1924, Feulgen și Rossenbeck pun la punct metoda de colorare cu reactivul Schiff (fuxina bazică) constatînd că, la nivelul nucleului, respectiv al cromozomilor, se află ADN.

În 1928, Griffith efectuează experiențe la Diplococcus pneumoniae, prin care constată că un tip de bacterie nevirulent poate fi transformat într-un tip de bacterie virulent, dacă este crescut în prezența extractului celular de la tipul virulent, a cărui virulență a fost anulată prin fierbere. Dar nu s-a putut afla care este agentul transformant.

În 1944, Avery, Mac Leod și MacCarty aduc dovada sigură a faptului că agentul transformant este ADN-ul. Cercetările lui Chargaff au dus la descoperirea faptului că proporțiile relative ale celor patru baze azotate din macromolecula de ADN, nu sînt întîmplătoare, cantitatea de adenină fiind întotdeauna egală cu aceea de timină iar cea de guanină cu aceea de citozină.

Deci, s-a fundamentat existența unor legături precise între bazele azotate purinice și pirimidinice.

Ulterior, s-a admis că specificitatea genetică (fenomenul ereditar) este legată de modul exact de așezare a acestor baze azotate în molecula de ADN (J. D. Watson, 1974).

În 1953, Watson și Crick stabilesc structura complementară, dublu-catenară, dublu spiralată, a ADN-ului. Gena este considerată o porțiune din macromolecula de ADN iar funcția genetică este înscrisă în această macromoleculă de ADN, fiind dată de modul cum se succed bazele azotate în ea. Rolul ADN-ului ca moleculă genetică este demonstrat și de stabilitatea sa metabolică, mult mai mare față de a altor molecule celulare, la care se constată o sinteză și o desfacere rapidă. Atomii, odată încorporați în ADN, nu-l mai părăsesc cît timp celula își desfășoară activitatea normală.

Descoperirea structurii dublu-elicoidale, complementare, a ADN-ului a constituit baza explicării mecanismului de replicaţie a materialului genetic, a modului cum poate fi transmisă informaţia genetică, oricît de mare ar fi ea, de-a lungul generaţiilor.

Descoperirea modului cum este stocată informaţia genetică, ca şi a fenomenului de transcripţie şi translaţie a acesteia în procesul sintezei proteice, a stat la baza elaborării conceptului de cod genetic şi de reglaj genetic.

Studiul replicaţiei materialului genetic la nivel molecular şi la nivel cromozomal a dus la postularea modelului semiconservativ de replicare, model care asigură cu fidelitate transmiterea informaţiei genetice de-a lungul generaţiilor celulare şi este în deplin acord cu datele geneticii clasice referitoare la aşezarea liniară a genelor pe cromozomi.

În momentul de faţă, explicarea oricărui fenomen la nivel celular nu poate fi făcută fără a apela la datele geneticii moleculare. Cu aceasta se deschide un nou domeniu de investigaţie care este acela al citogeneticii moleculare.

Studiul proceselor intime care se desfăşoară în cadrul diviziunii celulare capătă o semnificaţie majoră în conturarea profilului acestui domeniu de interferenţă.

Capitolul II

CROMOZOMUL — STRUCTURĂ ŞI MORFOLOGIE

1. STRUCTURA OPTICĂ ŞI ELECTRONMICROSCOPICĂ A CROMOZOMULUI EUCARIOTELOR

Cromozomii sînt elemente structurale discrete, de natură nucleoproteică, purtătoare ale unor secvenţe liniare de gene strîns înlănţuite (lincate), care controlează proprietăţile ereditare ale organismului. Ei se colorează specific cu coloranţi bazici şi apar de regulă, la eucariote, doar în timpul diviziunii nucleare.

Pentru organismele procariote s-a propus ca structurile purtătoare de ADN, analoage cromozomilor eucariotici, să se numească genofori. Genoforul reprezintă o unitate structurală purtătoare a unui grup de gene strîns lincate. El corespunde deopotrivă cromozomului eucariotic (complex nucleohistonic) şi cromozomului circular bacterian reprezentat de o singură moleculă dublu helicoidală de ADN. De asemenea şi miezul de acid nucleic de la virusuri este un genofor, potrivit definiţiei acestuia.

Este aproape unanim acceptată ideea că la nivel ultrastructural cromozomii sînt nişte structuri fibroase, reprezentate de moleculele filamentoase de ADN. La nivelul lor, molecula de ADN apare sub forma unei fibre încolăcite. Cromozomii reprezintă unităţi structurale capabile de autoreplicare.

Observate şi studiate mai întîi de către Fleming, în celula animală, şi de către Strasburger în 1870, în celula vegetală, ca apărînd în timpul diviziunii nucleare, corpurile cromatice sînt descrise la 1888 de către W. Waldeyer, sub numele de cromozomi. Este cazul să amintim aici observaţiile lui Fleming asupra „despicării longitudinale a corpurilor cromatice şi ale lui Baranetzky care, la 1880, descrie structura „sinuoasă, şerpuitoare a acestor corpuri cromatice". În ultimul timp, Chevrement şi Lettré, dar mai ales Bajer, au efectuat precise şi interesante cercetări cinematografice asupra cromozomilor.

Numărul şi morfologia cromozomilor sînt constante pentru o anumită specie, în condiţii normale. Numărul cromozomilor variază în lumea vie între limite foarte mari. Astfel bacteriile au de regulă un singur cromozom circular, viermele nematod Ascaris megalocephala univalens are 2 cromozomi, în celulele somatice, iar unele specii de radiolari au 1500—1600 de cromozomi. La plante, la o algă conjugată, Netrium, au putut fi identificaţi în jur de 500 cromozomi, pe cînd compozita Haplopappus gracilis are numai 4 cromozomi. Omul are 46 de cromozomi. Numărul de cromozomi nu este o caracteristică a gradului de evoluţie ci este doar o caracteristică de specie.

La microscopul optic se constată că, pînă la sfîrşitul metafazei, începutul anafazei, cromozomul este alcătuit din două unităţi funcţional-structurale, longitudinale, care s-au numit cromatide. Fiecare cromatidă este formată din două unităţi longitudinale (jumătăţi de cromatide). Cromatidele sînt unite la nivelul unei constricţii primare numită centromer. Între centromer (constricţie primară) şi capătul cromozomului se poate afla constricţia secundară, care poate fi despiralizată sau uşor spiralizată şi mai mică în diametru decît regiunile adiacente, în profază sau metafază, sau are acelaşi diametru ca al regiunii înconjurătoare şi aceeaşi spiralizare, dar se colorează mai puţin intens. Porţiunea distală a cromozomului, plasată între constricţia secundară şi capătul cromozomului, se numeşte satelit sau trabant.

La microscopul optic, unii autori au descris şi o membrană cromozomală şi substanţa de bază sau matricea cromozomală. În matricea cromozomală sînt înglobate cele două cromoneme care se prezintă sub forma unor filamente cu diametrul de 0,3—0,5 μm, răsucite în spirală, formînd un helix cu diametru de 1 μm. Matricea cromozomală este Feulgen-negativă. Ea se subţiază sau lipseşte la nivelul constricţiilor primare şi secundare, acolo unde şi cromonemele sînt drepte, pierzînd spiralizarea. Pe cromoneme, din loc în loc se află nişte îngroşări, care s-au numit cromomere, şi care dau cromonemelor aspect moniliform. Cromonemele reprezintă deci elementele filamentoase, cromatice ale cromozomului, ultima unitate vizibilă a cromozomului la microscopul optic (Fig. 3). Cu excepţia unor zone din cromozom, care rămîn spiralizate în interfază şi care s-au numit cromocentri (caracteristici nucleilor interfazici cu procromozomi şi care sînt în număr egal cu acela al cromozomilor), cromonemele în interfază sînt despiralizate. Cromocentrele sînt regiuni heterocromatice din jurul centromerului care în fazele diviziunii iau aspect de cromomere.

În interfază, substanţa nucleară numită cromatină, formată din complexe nucleohistonice, se prezintă sub forma unor filamente

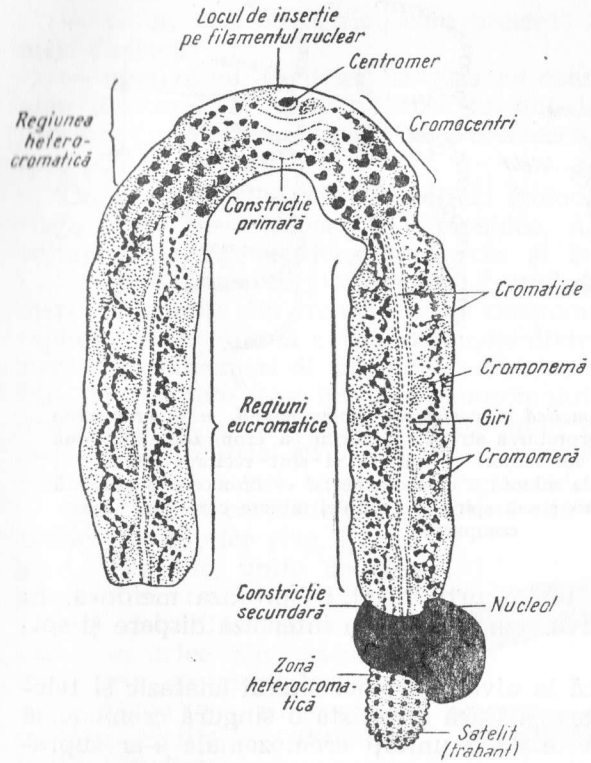


Fig. 3 — *Schema structurii cromozomului la microscopul optic* (după I. Dăbală şi L. Gavrilă, 1971).

subţiri, încolăcite, care s-au numit cromoneme. În acelaşi timp, cromonema reprezintă filamentul de bază al cromozomului care menţine organizarea esenţială a cromozomului pe parcursul ciclului celular (B. John şi K. R. Lewis, 1968). Prin condensarea cromatinei, rezultată în urma spiralizării acestor filamente (cromoneme), fenomene ce au loc la debutul diviziunii nucleare (Fig. 4), se individualizează cromozomii ce pot fi observaţi la microscopul fotonic. Spiralizarea cromonemelor în profază duce la formarea de spirale cu „pasul" mic care s-a numit spirală minoră şi datorită căreia cromozomii pot fi evidenţiaţi microscopic.

Aspectul sinuos sau întortocheat, pe care-l prezintă cromozomii la apariţia lor în profază, corespunde la ceea ce se numeşte „superspiralizare" care dispare pe măsură ce cromozomii devin scurţi şi groşi, în metafază (G. Deysson, 1973).

Spirala minoră este continuată, în metafază, de o nouă spiralizare care duce la formarea a încă 20—30 de ture şi implicit la scurtarea şi îngroşarea corespunzătoare a cromatidelor şi această spiralizare s-a numit somatică sau majoră. Numărul, dimensiunea, distribuţia şi modelul de aşezare a cromomerelor sînt specifice pentru o anumită specie, la un anumit stadiu de dezvoltare. Numărul de cromomere pe cromozom este mult mai mic în profaza mitotică (în

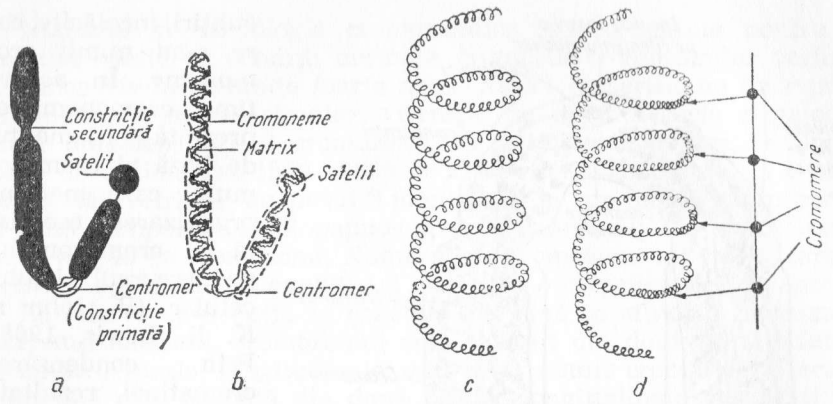


Fig. 4 — *Reprezentarea schematică a morfologiei cromozomului.* *a* — cromozom anafazic în „V"; *b* — interpretarea structurii interne a cromozomului: două cromoneme prezintă spirala lor minoră și majoră și sînt reciproc încolăcite; *c* — spirala majoră și spirala minoră a cromonemei; *d* — cromonema prezintă cromomere interpretate ca zone sau spire ale spiralei minore care sînt foarte compacte.

care și cromozomii sînt mai scurți) decît în profaza meiotică. În telofază dispare spiralizarea somatică iar în interfază dispare și spiralizarea minoră.

Sînt date care arată că la nivelul cromozomului anafazic și telofazic se află 2—4 cromoneme. Dacă ar exista o singură cromonemă per cromatidă atunci aceste două unități cromozomale s-ar suprapune. Cînd sînt mai multe cromoneme per cromatidă acestea sînt numite jumătăți sau sferturi de cromatidă. Recent, Bajer a demonstrat, prin studii cinematografice, la microscopul cu contrast de fază, în celulele endospermului de Haemanthus sp., dubla fasciculare a cromatidelor, ceea ce înseamnă că pentru fiecare cromatidă revin cîte două cromoneme. Centromerul este o structură complexă. Cercetările lui Lima-de-Faria (1972) au arătat că la sfîrșitul profazei, în metafaza și anafaza mitozei, centromerul este mai subțire și mai slab colorat decît brațele cromozomului. După tipul de activitate centrică se deosebesc:

— cromozomi monocentrici, care au un singur centromer funcțional, fiind cel mai comun tip de cromozom;

— cromozomi cu centromer difuz, care au mai multe regiuni centrice specifice de-a lungul lor. Fragmentarea acestor cromozomi, cu centromeri difuzi, duce la mărirea numărului de cromozomi, fenomen care se numește agmatoploidie sau polisomatie;

— cromozomi policetrici, care prezintă 3 sau mai mulți centromeri distincți;

— cromozomi acentrici, care nu au centromeri (se află la unele alge, de exemplu, legați de lipsa fusului de diviziune, centromerul reprezentînd regiunea localizată a cromozomului, legată de mișcarea spre poli a acestuia).

Cromozomii cu centromeri difuzi (holocentrici) se află la numeroase grupe de artropode (Scorpionidae, Acarina, Chilopoda și Insecta) unele alge conjugate, precum și la familiile Juncaceae și Ciperaceae dintre Angiospermae. Prin fragmentare, în urma iradierii, porțiunile din cromozomi cu centromeri difuzi continuă să se replice și se comportă normal în unele diviziuni mitotice. La cromozomii cu centromeri difuzi, fibrele fusului de diviziune se atașează, fiind împrăștiate de-a lungul cromozomului, spre deosebire de cromozomii monocentrici la care microtubulii vin ca în mănunchi. Cromozomii policentrici au 3-n centromeri localizați de-a lungul lor. Se întîlnesc la Parascaris ca și la alți reprezentanți al familiei Ascaridae.

S-a stabilit că centromerul constă din 2 pînă la 5 perechi de cromomere eliptice (Fig. 5), mai greu colorabile, unite de filamente fine care se colorează și mai slab. Cromomerele regiunii centrice sînt asemănătoare prin structura lor cu acelea găsite pe cromozom în profaza mijlocie (Stebbins, 1971). Studiat electronmicroscopic, centromerul reprezintă o structură fundamentală fibrilară, regiunea centromerică constînd din numeroase fibre cromatice care trec de la o cromatidă la cealaltă ca fibre intercromatidice, asemenea fibre intercromatidice putînd să apară și în alte regiuni ale cromozomului, nu numai la nivelul centromerului. Numărul estimativ de microtubuli (ce aparțin fusului de diviziune) conectați la centromerul cromozomilor metafazici este de 70—200. Folosind tehnica fixării

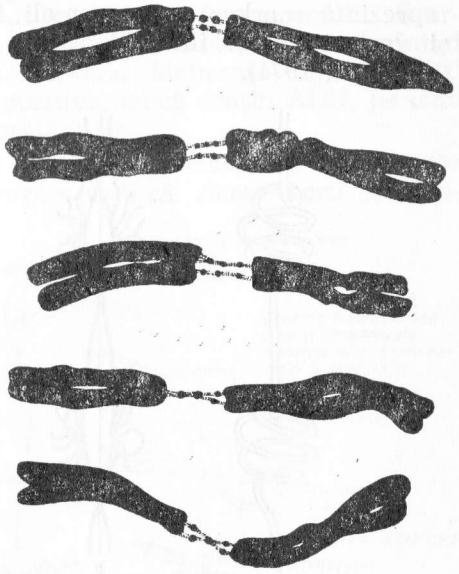


Fig. 5 — *Structura centromerilor la cromozomii metafazici de Hyacinthus orientalis* (după Lima—de—Faria. din Stebbins, 1971).

duble cu glutaraldehidă și OsO_4, după o prealabilă tratare cu colcemid, s-a putut constata, cu ajutorul microscopului electronic, că centromerul este alcătuit dintr-un miez dens înconjurat de o zonă mai puțin densă, în care numeroase microfibrile se împletesc în unghiuri drepte. El se prezintă ca o structură tripartită.

Cromomerele, dispuse moniliform de-a lungul cromonemei, sînt deosebit de clare în stadiile inițiale (în speță leptoten) ale meiozei. La cromozomii uriași din glandele salivare de la Drosophila melanogaster, cromomerele stau alăturate în număr mare, formînd discurile. Cromomerele apar la rîndul lor ca structuri spiralate (Fig. 6), în speță la cromozomii meiotici. Acest lucru a fost dovedit prin întinderea acestor cromomere cu ajutorul micromanipulatorului, ele apărînd sub forma unui filament uniform. Volumul lor crește pe măsură ce profaza meiotică progresează, ceea ce este încă un indiciu, că aceste cromomere sînt structuri spiralate. Numărul, forma și secvența cromomerelor sînt identice pentru cromozomii omologi.

În afară de cromocentri și cromomere la cromozomii de porumb și Ornithogalum virens au mai fost descrise și niște corpuri (blocuri) sferice, heterocromatice, numite protuberanțe (knobs) care apar la capetele sau la mijlocul cromozomilor. Blocurile heterocromatice reprezintă markeri cromozomali importanți în delimitarea raselor și varietăților și în evidențierea rearanjamentelor cromozomale (Stebbins, 1971).

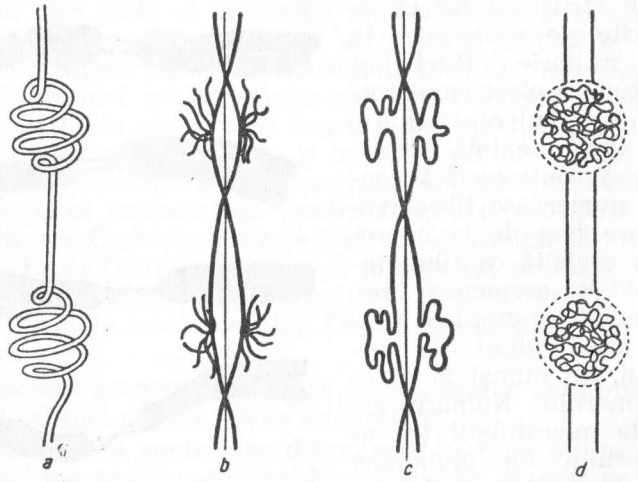


Fig. 6 — *Reprezentarea schematic a structurii cromomerelor*: *a* — după Ris; *b* și *c* — după Moses; *a* și *c* — după Mühlethaler; *d* — după Frey-Wyssling (din E. Peveling, 1968).

Cromomerele au fost studiate cu interes deosebit, deoarece s-a presupus că în ele se află locii genelor. Dar această idee a fost abandonată deși Pelling (citat de Peveling, 1968), folosind metoda autoradiografică, a evidențiat că aceste cromomere pot reprezenta unități de replicație în interiorul cromozomului. După unele ipoteze cromomerele sînt considerate repliconi (unități replicative) la eucariote, similare cromozomului bacterian sau genoforului viral. Se apreciază că greutatea moleculară a unei cromomere este de 30×10^6 (la Chironomus sp.) adică apropiată de aceea a bacteriofagilor.

Existența unei matrice cromozomale în investigații la microscopul optic nu a fost recunoscută de către toți cercetătorii, dar ea a fost adeseori descrisă. Astfel, s-a constatat că la Trillium grandiflorum și Allium cepa, colorabilitatea matricei crește de la profază înspre metafază și scade din nou în telofază. Și McClintock a evidențiat la cromozomii de porumb matricea cromozomală. Darlington (1963) a respins ideea existenței unei matrice cromozomale. S-a constatat că axa cromozomului este alcătuită din două cromoneme paralele spiralizate. În locurile unde acestea sînt puternic spiralizate se formează cromomerele. Între cromomere, cromonemele formează bucle. Ribonucleaza și enzimele proteolitice dizolvă buclele și cromomerele, neavînd nici un efect asupra axului cromonematic. Dimpotrivă, dezoxiribonucleaza digeră axul cromonematic, determinînd fragmentarea cromozomului. La izopodul Meinertia, la începutul ovogenezei, buclele sînt Feulgen-pozitive, adică conțin ADN, pe cînd ulterior sînt pironinofile, adică conțin ARN.

Microscopia electronică nu a reușit să elucideze multe aspecte ale structurii cromozomale, controversate încă. Acest lucru pare incredibil, date fiind remarcabilele succese pe care le-a dobîndit genetica moleculară.

Cromozomul interfazic, despiralizat (Fig. 7) este funcțional, căci în acest stadiu din ciclul celular se realizează transcripția informației genetice în cadrul replicării cromozomului, respectiv a ADN-ului. Cu trecerea spre diviziune începe spiralizarea cro-

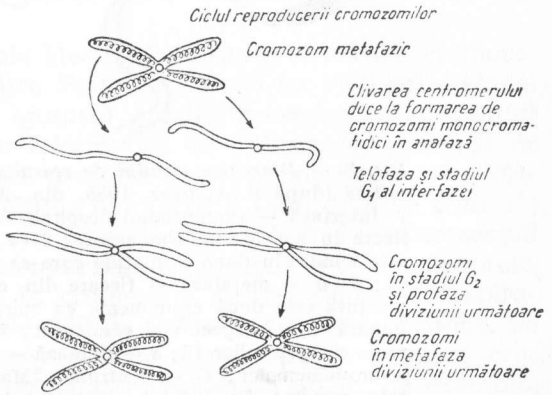


Fig. 7 — *Ciclul reproducerii cromozomului* (schemă).

monemelor şi cromozomul trece în starea transportoare, dedublîndu-se şi trecînd în celulele fiice (Fig. 8).

Spiralizarea cromozomului este de trei feluri: relaţională (elementele ce se spiralizează apar ca o funie, înfăşurîndu-se unul în jurul celuilalt, putînd fi separate numai prin despiralizare), internă (prin care se măreşte dimensiunea spirelor şi se micşorează numărul acestora, ducînd la structurarea şi îngroşarea cromozomului) şi relictă (rămasă pînă în profaza diviziunii următoare). În cadrul spiralizării apar două feluri de spire: paranemice (subunităţile cromozomale pot fi separabile dat fiind faptul că ele sînt libere spiralizîndu-se independent unele de altele) şi plectonemice (în care subunităţile cromozomale prezintă o spiralizare relaţională — se răsucesc unele în jurul celorlalte).

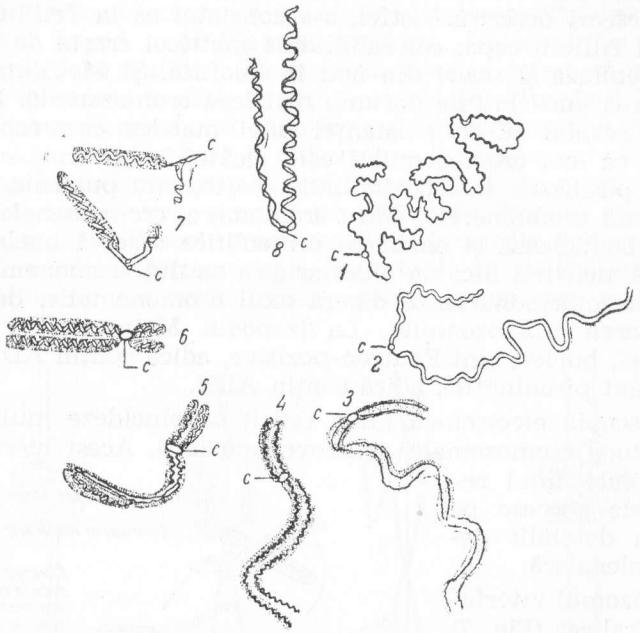


Fig. 8 — *Diagrama ciclului de spiralizare a cromonemei în mitoză* (după F. A. Saez, 1955, din. A. Nougaréde, 1969). *1.* interfază — cromozomul despiralizat cu vestigii de spiralizare în zonele mai condensate; *2—4* — fiecare cromozom este scindat în două cromatide care se vor separa în anafază; *5—6* — metafază — fiecare din cele două cromatide prezintă cele două cromoneme cu spirala majoră şi spirala minoră, avînd aspect mai condensat; *7* — anafază — separarea cromozomilor fii; *8* — telofază — o nouă despiralizare a cromonemelor; *C* — centromer. Matricea este reprezentată punctat. La nivelul centromerului se află doar spirala minoră.

Spiralizarea cromonemelor nu afectează regiunea centromerului (constricţie primară) ca şi constricţia secundară (constricţie deosebit de accentuată, permanentă, localizată pe unul din braţele cromozomului prin care este izolat de restul cromozomului un segment cromozomal care s-a numit satelit sau trabant; după cum am văzut această constricţie secundară funcţionează ca regiune organizator nucleolar).

Capetele cromozomului s-au numit telomere. Ele au unele proprietăţi speciale dintre care unele asemănătoare cu ale centromerilor. Telomerele au o structură particulară care le conferă o anumită polaritate. Ele sînt considerate ca regiuni terminale alcătuite dintr-o telogenă specială ce poate fi compusă şi complexă ca funcţiune. Ele au o anumită polaritate care face să fie evitată unirea capetelor similare ale cromozomilor sau unirea cu fragmente cromozomale. Aceste telomere pot deveni labile sub influenţa anumitor factori mutageni şi în acest caz se pot uni cu fragmente cromozomale. După Lima-de-Faria şi Sarvella, telomerul este o „structură complexă, constituită din cîteva segmente diferenţiate şi nu dintr-o singură bandă sau o cromomeră". La secară, după aceşti autori, la nivelul telomerelor, sînt cel puţin 8 segmente, 4 cromomere şi 4 fibrile. Telomerul posedă proprietatea esenţială a monopolarităţii, aşa încît o ruptură la nivelul telomerului va produce totuşi capete stabile. Regiunea telomerică poate funcţiona ca regiune centrică şi organizator nucleolară. Capetele cromozomului, nealterate structural pot manifesta activitate neocentrică, adică să funcţioneze ca centromeri secundari (B. John şi K. R. Lewis, 1969). Ele sînt de natură heterocromatică.

Cercetările de microscopie electronică asupra structurii cromozomului au fost iniţiate de către Palay şi Claude cu ajutorul metodei replicei. În 1954, Ris, cu ajutorul acestui procedeu, a evidenţiat structura cromozomului, la microsporii de Lilium. În condiţii de extensie maximă, cromozomul prezintă condiţii mai bune pentru studiul electronoptic, avînd o lăţime de numai 0,3 μm, faţă de 1 μm cît are în medie cromozomul, în timpul condensării. La microscopul electronic nu s-au evidenţiat matrixul, cromonemele şi cromomerele, în schimb, s-au evidenţiat în cromozomi fibrile elementare spiralizate, cu un diametru de 20—200 Å, alcătuite din nucleohistone. Se admite că mai multe asemenea fibrile elementare formează o cromonemă. La microscopul electronic, cromozomul uman, de exemplu, apare ca o împletitură neregulată de fibre de cromatină de 200—

500 Å diametru. Extremităţile libere ale acestor fibre, la capetele cromozomului, formează bucle (Fig. 9), iar regiunea centromerului este ocupată de o mulţime de fibre mai mult sau mai puţin paralele care trec de la un braţ la altul. Această structură corespunde modelului lui Du Praw (1970) după care cromatida cromozomului este formată dintr-o singură fibră foarte lungă, repliată de un număr mare de ori în sens transversal şi longitudinal, modelul acesta fiind în acord cu replicarea semiconservativă a cromozomului (Fig. 10).

La cromozomii mitotici şi meiotici, la speciile care au fost studiate, apar clar două unităţi fibrilare: o unitate de 100—200 Å şi alta de 1 000—2 000 Å (0,1—0,2 μm). Unitatea mai mică s-a numit, după cum am văzut, fibrilă elementară, microfibrilă sau subcromonemă.

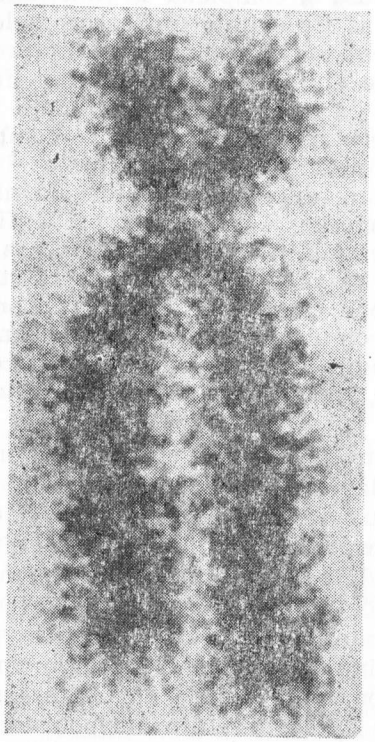


Fig. 9 — *Imaginea elecronmicroscopică a cromozomului uman* (din Du Praw, 1970).

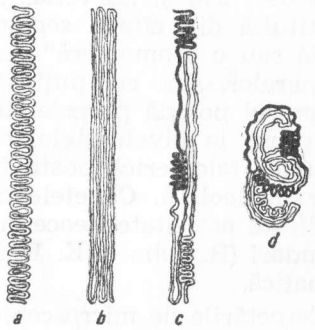


Fig. 10 — *Variate modele posibile de cutare (pliere)a unităţii cromatidice fibrilare.*
a — pliere transversală; *b* — pliere longitudinală; *c* — pliere combinată transversală şi longitudinală; *d* — spiralizare cuaternară suprapusă pe modelul de pliere din c. Segmentul înnegrit al fibrei arată că distribuţia grain-urilor autoradiografice în metafază depinde de modelul de pliere după replicarea fibrei (după DuPraw, 1966, din DuPraw, 1970).

Structurile fibrilare încolăcite, de natură nucleohistonică, cuprinse între 100 şi 500 Å, sînt considerate de multe ori ca adevărate unităţi de structură ale cromozomului. La microscopul electronic s-a dovedit prezenţa mai multor fascicule elementare, fiecare cromatidă constînd din mai multe subunităţi. Aceste subunităţi pot fi cromonemele vizibile la microscopul optic sau unităţile submicroscopice ale cromonemelor. În secţiuni seriale, s-a apreciat că sînt 64 de cromoneme pentru o cromatidă în cromozomii profazici de Tradescantia, pe cînd Sparvoli, în 1965, indică pentru acelaşi obiect de studiu 4 cromoneme într-o cromatidă. La Crepis capilaris s-au evidenţiat, în cromozomii telofazici, 4 cromoneme. Cromonema are un diametru de 10 ori mai mare decît dublul helix de ADN.

E. Stubblefield şi W. Wray (1971), studiind structura cromozomului de hamster chinezesc, la microscopul electronic, au apreciat că fiecare jumătate de cromatidă constă din două axe de nucleoproteine unite într-o singură formaţiune fibrilară cu multe bucle de cromatină, pe care au numit-o epicromatină, ataşate de-a lungul axei nucleoproteice. Aceste bucle de epicromatină apar a fi fibre încolăcite, de 250 Å, ce conţin circa 75% din ADN cromozomal. Sînt două opinii privind structura cromatidei (cromozomul anafazic):

— una uninemică, unifibrilară, după care cromatida constă dintr-un singur lanţ de material genetic, încolăcit într-o manieră complexă;

— alta multinemică — multifibrilară — potrivit căreia cromatida este multistratificată, alcătuită fiind din 2 — n catene nucleohistonice.

Structura binemială şi multinemială este susţinută de modelul de replicare a ADN-ului la Chlamydomonas reinhardi, aşa după cum a stabilit Sueoka et al. (1967) şi de datele de denaturare şi renaturare obţinute de D. Laird (1971) şi de J. Frederic (1969).

Pe baza celor mai multe şi concordante date de microscopie electronică, pentru cromozomii plantelor superioare, Marquadt a alcătuit un model de infrastructură a cromozomului care este prezentat în figura 11.

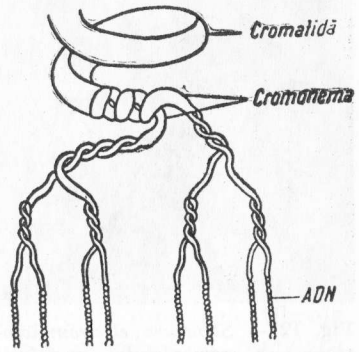


Fig. 11 — *Modelul structural tetrafascicular al cromozomului* (din E. Peveling, 1968).

În acest model se porneşte de la dublul helix de ADN, cu spiralizare

caracteristică, o treaptă de spiralizare continuînd pe următoarea. Cîte două unităţi spiralizate se aşază împreună şi formează ordinul imediat superior. Fibrilele cromozomale au putut fi observate atît la cromozomii meiotici de la Tradescantia cît şi la cromozomii mitotici şi meiotici de Characeae, dar nu pe toată lungimea cromozomului. Microscopia electronică prezintă date controversate referitoare la existenţa matricei cromozomale. Unele electronografii sugerează prezenţa a două categorii de substanţe la nivelul cromozomului; una mai puţin întunecată omologată cu matricea şi alta mai contrastantă (întunecoasă), substanţa cromonematică.

Cromozomii condensaţi au o structură spiralizată. Spiralizarea cuaternară prezintă giri de ordinul a 2.000 Å diametru, ce se compară în morfologie cu interpretarea diagramatică a lui Du Praw (1970), a unei singure cromoneme. Structura fină a cromozomilor umani, după A. Mc Dermott (1968), este reprezentată a fi alcătuită din unităţi spirale regulate de 45—60 Å diametru. Aceste unităţi de bază apar atît în nuclei interfazici, cît şi în cromozomi condensaţi şi constau din 2 microfibrile încolăcite cu o spirală de 60 Å diametru. Microfibrilele sînt reciproc spiralizate şi sînt întotdeauna bipartite. Unitatea de bază structurală a cromozomului este alcătuită din două microfibrile intim spiralizate, de 45—60 Å diametru. Ele sînt neregulat dispuse în spire cuaternare, în cromozomii condensaţi (Fig. 12).

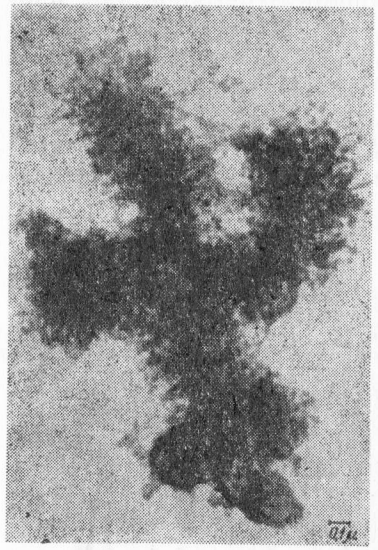


Fig. 12 — *Structura electronmicroscopică a cromozomului metafazic uman la mărirea de cca. 61.000* (după Gall, 1966, din B. John şi K. R. Lewis, 1969).

Fascicule de fibre cu lăţimea de 200—250 Å apar alături de fascicule de fibre late de 500 Å. Aceste fascicule nu reprezintă unitatea fundamentală de structură a cromozomului căci ele pot fi desfăcute mai departe în fibrile lungi cu lăţimea de 40 ± 10 Å. Pe cromozomi izolaţi s-a evidenţiat o structură ultrafină tetrafasciculată. Fasciculele sînt fibrile groase de 200—250 Å care adunate într-un singur fascicul constituie o cromatidă profazică. Fasciculul fibrilar, ca un tot, este spiralizat după un ax propriu formînd cromatida. De fapt, fiecare fibrilă este

caracterizată de o structură în spirală. Numărul fibrelor per cromatidă este o variabilă în funcţie de gen şi specie (E. Peveling, 1968).

Cromomerele au fost studiate cu ajutorul microscopului electronic, la cromozomii leptotenici de Lilium longiflorum. S-a demonstrat că în regiunea cromomerelor, cromonemele sînt dens spiralate. Aceeaşi concluzie a fost trasă şi din studiul cromozomilor politeni de la Drosophila melanogaster. Mühlenthaler consideră cromomerele o aglomerare densă de elemente fibrilare. Nu s-a lămurit încă dacă elementele fibrilare reprezintă discuri sau fibrile scurte, terminate liber. Frey-Wyssling consideră cromomera drept o fibră de ADN închisă şi măciucată.

Cercetările lui Trosko şi Wolf, care au folosit tratamentul enzimatic cu tripsină, au stabilit cu certitudine existenţa a două semicromatide pentru fiecare cromatidă, la fiecare cromozom, la organismele superioare.

La cromozomii din profaza meiotică de la şobolani, raci, lăcuste etc., Moses şi Fawcett au descris, independent, încă din 1956, o structură centrală, longitudinală, lată de 600—700 Å. Filamentul central dens este înconjurat de o parte şi de alta de o regiune mai densă electronoptic. Moses a stabilit ulterior că această structură axială apare în pachiten prin împerecherea cromozomilor omologi fiecare pereche de cromozomi avînd propriul său complex sinaptinemal. El prezintă trei elemente longitudinale dispuse paralel. Complexele sinaptinemale tipice sînt caracteristice stadiului de pachiten al meiozei.

Elementele externe, dense electronoptic sînt reprezentate de cromozomi omologi şi sînt dispuse la 120—150 μm faţă de elementul central liniar. Din elementele axiale porneşte cromatina sub forma unor fibrile groase de 70—150 Å. Moses admite că aceste microfibrile sînt de natură nucleoproteică. În cadrul complexului sinaptinemal, elementele latero-axiale prezintă structură tripluaxială. La Paeonia tenuifolia, Peveling (1968) a descris cromozomi leptotenici laţi de 0,4—0,6 μm, formaţi din fibrile axiale şi fibrile laterale. Ambele tipuri de fibrile au un diametru de 100 Å. Din punct de vedere morfologic aceşti cromozomi seamănă cu cromozomii de tip lampbrush, care pot fi observaţi la microscopul optic, în ovocitele de amfibieni. Cromozomii leptotenici prezintă o morfologie similară aceleia a cromozomilor lampbrush. S-a stabilit că în interfază, fibrele de cromatină converg spre zone inelare ale membranei nucleare de care se prind, rămînînd prinse de fragmente şi atunci cînd membrana nucleară este fragmentată.

În zigoten se formează complexul sinaptic tripartit, ale cărui elemente laterale sînt prinse prin capetele lor de membrana nucleară, încă din leptoten. Din elementele laterale se desprind bucle formate din fibre latero-centrale (L-C) care, unindu-se în zona centrală, formează elementul central (Fig. 13). În pachiten, cromatina se condensează în jurul complexului sinaptic. Fibrele de cromatină se prind de elementele laterale ale complexului, iar aglomerarea locurilor de prindere dă naştere la cromomere care apar şi la microscopul optic. În diploten, dar mai ales în diachineză, complexul sinaptic se fragmentează, se descompune, iar fibrele de cromatină iau un aranjament caracteristic cromozomilor mitotici, apărînd evidente cromatidele.

Comings şi Okada (1970) au stabilit că fibrele latero-centrale (L-C) sînt formate din două fibre ce au o grosime de circa 45 Å fiecare. Tot astfel, fibrele laterale au o structură dublu-filamentoasă. După Moses şi Coleman (1964) proteina complexului sinaptic este de natură bazică de tip histonă bogată în arginină. După Comings şi Okada (1970) elementul central al complexului sinaptinemal nu ar fi suprafaţa de împerechere a cromatidelor omoloage, complexul facilitînd numai împerecherea la nivel molecular, făcînd posibilă o apropiere intimă a cromozomilor.

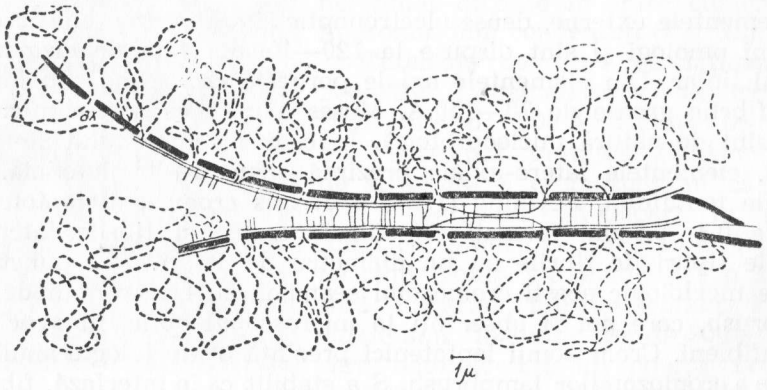


Fig. 13 — *Diagrama reprezentînd asamblarea probabilă a complexului sinaptinemal din două axe longitudinale.* Elementul central poate fi reprezentat de fibrile de ADN ce pornesc de la cei doi cromozomi omologi de pe fiecare parte a lor (din DuPraw, 1970).

2. STRUCTURA GENOFORULUI BACTERIAN ŞI A CROMOZOMULUI DINOFLAGELATELOR COMPARATIV CU ACEEA A CROMOZOMULUI EUCARIOTIC

Dacă vom numi cromozomi şi structurile purtătoare de informaţie genetică, echivalente nucleilor, de la bacterii şi cianoficee, atunci, la aceste grupe de organisme procariote există cromozomi numai în accepţiunea aceasta de genofor. Din punct de vedere structural cromozomii organismelor eucariote nu pot fi echivalaţi cu „cromozomul" sau mai bine zis cu genoforul bacterian. Pe de altă parte, s-a arătat că genoforul bacterian nu există ca o moleculă de ADN simplă şi inelară ci, ca şi la dinoflagelate, molecula de ADN prezintă o structură periodică, o structură terţiară.

Ipoteza lui Sutton şi Boveri, referitoare la rolul cromozomilor în ereditate poate fi extinsă şi la bacterii, ceea ce este în deplină concordanţă cu datele de analiză genetică şi biochimică.

Structura cromozomului bacterian a fost deplin înţeleasă abia după ce s-au găsit structuri echivalente la organisme superior organizate bacteriilor, cum este grupul mezocariot al dinoflagelatelor.

Cromozomul bacterian, ca şi cel al dinoflagelatelor, reprezintă cel mai simplu tip de cromozom cunoscut pînă acum. Cromozomii la dinoflagelate nu trec printr-un stadiu tipic de despiralizare interfazică, prezentînd, ca şi la structurile cromozomice bacteriene, fibrile de 30 Å, aşezate în benzi transversale cu orientare oblică faţă de axa longitudinală a cromozomului. O structură asemănătoare aceleia de la cromozomul bacterian şi cromozomii dinoflagelatelor s-a evidenţiat în kinetoplastele de Trypanosoma cruzi. Datele de microscopie electronică i-au permis lui Giesbrecht să elaboreze un model de structură a cromozomului la dinoflagelate şi bacterii numit „sistem de răsucire în serpentină". Acest model prezintă (Fig. 14 un mers în buclă al fibrelor de ADN. El are structuri accesorii pe care stau buclele de ADN. Direcţia spirei fibrei de ADN se modifică periodic, încît dă imaginea unei serpentine. Prima treaptă de răsucire pe spirala de ADN reprezintă sistemul minor de spiralizare. Sistemul minor este spiralizat în acelaşi mod încă o dată, formîndu-se astfel sistemul major de spiralizare. Prin dilatarea cromozomului, buclele pot fi împinse lateral sau oblic.

Pentru a înţelege mai uşor structura cromozomului bacterian şi a cromozomului dinoflagelatelor s-au propus mai multe modele de structură: 1) model cu fibrilele de ADN orientate în formă de fascicule spiralate; 2) model cu fibrilele de ADN cu structură de

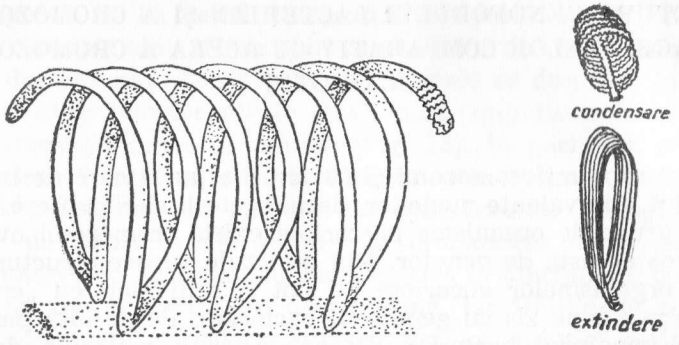


Fig. 14 — *Modelul lui Giesbrecht (1965) privind structura cromozomului la dinoflagelate și bacterii* (din E. Peveling, 1968).

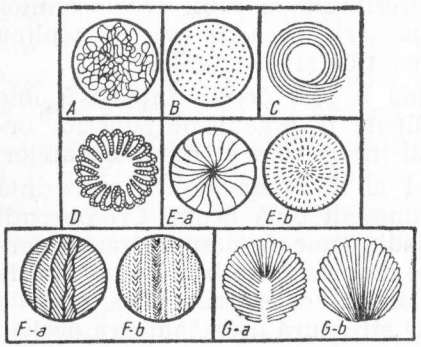


Fig. 15 — *Reprezentarea schematică a secțiunilor transversale și oblice prin diferitele modele de cromozomi:*

A — fibrile de ADN nearanjate, cu distribuție randomizată; *B* — fibrile de ADN aranjate în formă de fascicule; *C* — fibrile de ADN aranjate în formă de fascicule spiralate; *D* — fibrile de ADN aranjate în sisteme spiralate; *E* — fibrile de ADN aranjate radiar: *a* — secțiune prin zona de încrucișare a fibrilelor de *ADN*; *b* — secțiune în zona intermediară a fibrilelor; *F* — fibrile de ADN orientate după un sistem de striuri longitudinale; *a* — aranjarea în straturi de fibrile; *b* — aranjarea în straturi suprapuse; *G* — fibrile de ADN aranjate într-un sistem de serpentine: *a* — aranjament în curbură; *b* — aranjament în evantai (după P. Giesbrecht și G. Drews, 1971)

sistem spiralat; 3) model cu fibrilele de ADN dispuse radiar; 4) model cu fibrile de ADN orientate transversal, în mai multe straturi subțiri, fiind alcătuite din mai multe fibrile orientate paralel, direcția fibrilelor formînd un unghi constant și, în sfîrșit, 5) model cu fibrile de ADN orientate transversal într-un sistem de serpentine (bucle) (Fig. 15), în care fibrilele de ADN formează un sistem în falduri (încreștit), dar fără torsiune, cu schimbarea periodică a direcției spirelor. Buclele fibrilelor de ADN pot fi comparate cu serpentinele ce permit ascensiunea unui munte conic. Buclele au lungimi diferite și pot ocupa întregul diametru al cromozomului.

La cromozomii bacteriilor și dinoflagelatelor au fost descrise structuri ajutătoare aflate la extremitatea cromozomilor. La bacterii, ca structură accesorie cromozomului bacterian, apare a fi mezozomul, o formațiune ce ține de membrana citoplasmatică. La dinoflagelate, structura accesorie a cromozomului este reprezentată de zone ale membranei nucleare. La locul de fixare a cromozomilor dinoflagelatelor, la membrana nucleară, spiralele de ADN (buclele sau perioadele de ADN) sînt orientate paralel cu membrana nucleară. Uneori, la bacterii, cromozomul se poate lega direct de membrana citoplasmatică fără intermediul structurilor accesorii.

La locul de legătură se află un complex enzimatic special, pe membrana citoplasmatică, care participă la sinteza ADN, la bacterii fiind vorba de un aparat de replicație complex al ADN-ului.

Fixarea cromozomilor dinoflagelatelor de membrana nucleară nu se realizează prin intermediul centromerilor, ci printr-o prelungire subțire a cromozomului, al cărei diametru corespunde cu o perioadă a ADN-ului. Legătura cromozom-membrană nucleară la dinoflagelate se realizează doar în timpul separării cromatidelor, proces ce are loc în stadiile mijlocii ale diviziunii. Este important de remarcat, că asemenea legături dintre cromozomi și membrana nucleară au fost evidențiate și la alte grupe de flagelate, ba chiar și la celulele umane la care se pare că membrana nucleară intervine în controlul sintezei ADN.

Spre deosebire de ceea ce se întîmplă la organismele eucariote, la bacterii cianoficee și dinoflagelate cromozomii sînt vizibili în tot ciclul celular. Microscopia electronică a demonstrat că la dinoflagelate cromozomii, în timpul diviziunii, se află în stare condensată și în acest caz ei posedă diametrul cel mai mic. Este o situație *exact* inversată față de aceea întîlnită la cromozomii eucariotelor. La dinoflagelate, diametrul cel mai mare al cromozomului apare la celulele vegetative normale, neaflate în diviziune. La dinoflagelate, cianoficee și bacterii lipsește o interfază tipică. Inițierea replicației ADN-ului și a ciclului cromozomal de spiralizare la aceste organisme depind de proteine inițiatoare care sînt sensibile la cloramfenicol. Dacă sinteza acestor proteine este inhibată se pot termina doar replicațiile deja începute, cromozomii fiind siliți să rămînă într-o stare în care nu se produce nici o replicare. Schimbarea formei cromozomilor la eucariote este determinată de procese antagonice de spiralizare și despiralizare. Fenomenul de condensare-expansiune la cromozomul dinoflagelatelor este determinat în măsură precumpănitoare doar de o modificare a diametrului cromozomului. Este o schimbare elementară a formei cromozomului. Cromozomii dinofla-

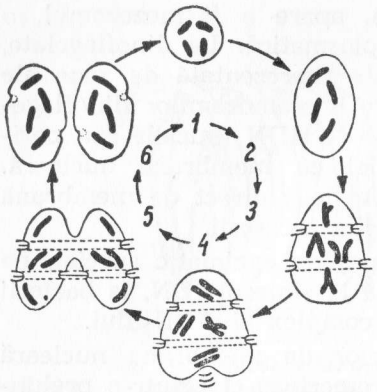


Fig. 16 — *Schema diviziunii la dinoflagelate* 1 — nucleu din celule ce nu se divid; nucleul este rotund, iar cromozomii sînt scurți și groși; 2 — nucleul capătă formă eliptică iar cromozomii apar sub forma unor structuri subțiri și puțin alungite; 3 — nucleul devine piriform și de ambele părți ale sale se formează pînă la 15 invaginații cilindrice ale membranei nucleare ce conțin numeroși microtubuli care străpung nucleul. Cromozomii se fixează de asemenea pe canale ale membranei nucleare în timpul stadiilor mijlocii ale diviziunii: 4 — diviziunea nucleară propriu-zisă începe cu o invaginare bazală a sa în locul unde se află aparatul Golgi. Cromozomii fii sînt complet separați și stau mai mult sau mai puțin paralel între ei sau sînt reciproc încolăciți; 5 — nucleul ia formă de halteră și cromozomii se separă spre polii opuși; 6 — separarea nucleilor fii și regresia invaginărilor laterale canaliforme ale membranei nucleare. Nucleii devin din nou rotunzi cu cromozomi scurți și groși (după P. Giesbrecht și G. Drews, 1971).

gelatelor sînt cei mai subțiri în cursul stadiilor de diviziune, deosebindu-se astfel radical, prin ciclul lor de spiralizare, de cromozomii eucariotelor care prezintă diametrul cel mai mare în metafază (mijlocul diviziunii). În celulele care nu se află în diviziune, cromozomii sînt scurți și groși. Cînd nucleul ia formă eliptică, comozomii se alungesc și se subțiază. Cînd nucleul devine piriform, se formează 15 invaginații cilindrice ale membranei nucleare, care conțin numeroși microtubuli în formă de fascicule și care perforează nucleul. Cromozomii se fixează pe aceste canale membranoase ale membranei nucleare în cursul stadiilor mijlocii ale diviziunii. Diviziunea nucleară propriu-zisă începe cu o invaginare bazală a nucleului pe locul pe care se află aparatul Golgi. Cromozomii fii nu mai sînt fixați pe invaginările canaliculiforme ale membranei nucleare, ci stau mai mult sau mai puțin paraleli între ei și uneori răsuciți unul în jurul celuilalt. Nucleul are formă de halteră, iar cromozomii se despart în direcții opuse spre poli (Fig. 16). Pe măsură ce se conturează nucleii fii, dispar invaginările canaliculiforme ale membranei nucleare. Cromozomii nu trec niciodată într-o stare interfazică păstrîndu-și și starea de condensare.

Se poate admite că la cromozomul bacterian și la cel al dinoflagelatelor, replicarea ADN-ului are loc în tot cursul ciclului celular cu excepția fazei de separare a cromozomilor fii, ei aflîndu-se în acest moment în stare inactivă, de condensare maximă. ADN-ul la aceste organisme se replică cînd cromozomul este structurat, cu alte cuvinte atunci cînd ADN-ul prezintă structură terțiară. De

aici izvorăște și neelucidarea modalității cum poate avea loc replicarea ADN-ului în această stare, la asemenea organisme.

Cromozomii dinoflagelatelor, deși numeroși, pot fi identici din punct de vedere genetic, purtînd fiecare aceleași gene (o modalitate prin care se realizează redundanța materialului genetic). Și la alt grup de organisme, Polimastigine, s-a remarcat trecerea cromozomilor din telofază în profază, fără a trece și prin interfază. Profaza reprezintă la acest grup stadiul de așa-zis repaus, care este foarte lung.

După cum se vede relația dintre moleculele de ADN și organizarea cromozomală este mai bine înțeleasă la procariote (bacterii) și mezocariote (dinoflagelate), deoarece la aceste organisme, ADN-ul nu este complexat cu proteinele bazice așa cum se întîmplă la eucariote. La bacterii există un dublu helix per genom, cu o lungime totală de 700—900 μm și o greutate moleculară de 2,3—4,6, 10^9 daltoni, pe cînd la o eucariotă, Lilium sp., de exemplu, există, după Taylor, 53×10^{-12} g de ADN per complement haploid și lungimea totală a ADN-ului este de $1{,}5 \times 10^7$ μm = 15 metri. ADN-ul nud apare ca un inel cu un singur loc pentru inițierea sintezei ADN-ului, care parcurge o dată tot inelul pentru fiecare ciclu de replicație bacteriană. Acesta este modelul de replicație propus de Cairns. Mai sînt însă și alte modele (vezi fig. 50).

La eucariote se află mai mult de doi cromozomi per celulă, iar cromozomii conțin o cantitate mult mai mare de ADN. La nivelul cromozomului eucariotelor, ADN-ul este asociat în mod constant cu histonele. Cromozomii eucariotelor suferă cicluri de spiralizare și condensare caracteristice în mitoză și meioză. ADN-ul din cromozomii eucariotelor, spre deosebire de ADN-ul circular de la procariote (în speță bacterii), este liniar. Doar moleculele de ADN din mitocondrii, cloroplaste și corpii bazali ai flagelilor de la eucariote sînt circulare, ceea ce este un argument pentru originea endosimbiotică a acestor organite.

Cromozomul eucariotelor prezintă multe puncte de replicație independentă, adică mai multe unități autoreplicative (repliconi) asemănătoare cromozomului bacterian. Cromatidele cromozomilor mitotici și meiotici sînt subdivizate longitudinal în cel puțin două subunități. Se poate ca fiecare jumătate de cromatidă să reprezinte un duplex de ADN, îndoit și spiralat, sau jumătățile de cromatide să fie ele însele jumătăți de helix dublu de ADN, așa încît cromatida este o singură unitate Watson-Crick. Dar este posibil ca fiecare

jumătate de cromatidă să fie o combinaţie de cel puţin două duble helixuri de ADN.

Pe baza experienţelor de degradare enzimatică cu DN-ază, s-a stabilit că numărul adevărat de subunităţi per cromatidă este de 2 pînă la 4. Nici microscopia electronică nu a adus suficiente clarificări în acest caz. Mai mult, microscopia electronică nu poate evidenţia structura helicoidală vizibilă cu microscopul optic a cromonemelor şi nu poate distinge constricţiile cromozomale. Mai multe clarităţi a adus microscopul cu contrast de fază, cu ajutorul căruia Bajer a arătat că ceea ce caracterizează cromozomul eucariotelor este răsucirea (spiralizarea) cromonemelor, lipsa spiralizării cromonemelor la nivelul centromerului şi natura bipartită a cromatidelor anafazice. Fibrilele de 100—250 Å, evidenţiate la microscopul electronic, reprezintă complexul ADN-histone al cromozomilor, care este alterat în urma tratamentului enzimatic cu DN-ază şi tripsină. Tratarea acestor fibrile cu pronază duce la înlocuirea histonelor, rămînînd o catenă fină de 25 Å diametru, care poate fi uşor digerată cu DN-ază şi care seamănă cu ADN-ul fagului lambda (λ). Din această cauză Ris a admis că fibrilele de 100 Å conţin un singur ADN dimer combinat cu proteina bazică. Fibrilele de 250 Å conţin, din aceste considerente, doi dimeri de ADN asociaţi cu histonele şi cationii bivalenţi. Rezultă că fiecare cromatidă poate fi compusă din două duble helixuri de ADN asociate cu histonele, ceea ce poate explica separarea semiconservativă a ADN-ului, aspectul dublu al cromatidelor la nivelul microscopului optic, apariţia aberaţiilor la nivelul semicromatidic şi independenţa fizică a unităţilor subcromatidice la unele coccide, aşa cum a fost remarcată de către Hughes-Schrader. Cromozomul de Vicia faba şi hamster chinezesc se comportă la iradiere ca unităţi duble la începutul perioadei de sinteză a ADN-ului.

Trecerea cromozomului eucariotelor din interfaza tîrzie în starea metafazică se realizează printr-un proces de spiralizare şi condensare, cînd lungimea cromozomului interfazic se micşorează de ordinul a 100 de ori. Condensarea cromozomului este pusă pe seama policationilor. Starea „extinsă" a cromozomului se datorează faptului că majoritatea grupărilor fosfat din ADN nu sînt legate de grupele cu valenţă pozitivă ale histonelor. Dacă competiţia dintre proteinele acide şi cele bazice pentru grupările negative din ADN este cîştigată de policationi, catenele de ADN se spiralizează, căci moleculele de ADN se pot asocia cu cele de histone. Ioni bivalenţi, precum cei de Ca^{++}, Mg^{++} intervin în contracţia cromozomală, întărind punţile

dintre ADN şi histone. Şi polianionii pot modifica proporţiile între fracţiunile histonice complexate cu ADN-ul, determinînd modificări structurale ale complexului dezoxiribonucleohistonic. Caspersson a remarcat scăderea de proteine din nucleu în timpul profazei, iar proteina care rămîne în cantitate mai mare este bogată în arginină, care, de fapt, este cea mai importantă proteină bazică a celulei. Aceste proteine, bogate în arginină, contribuie la condensarea cromozomului. Dimpotrivă, histonele bogate în lizină determină trecerea cromozomului din stare condensată în stare difuză. Grupările sulfitice joacă de asemenea un anumit rol în procesul spiralizării şi condensării cromozomului, iar atunci cînd ele sînt înlocuite de seleniu se ajunge la reducerea spiralizării cromozomului. Cantitatea de fosfolipide din cromozomi creşte cînd începe procesul de spiralizare. Segmentele ce se replică mai tîrziu, la cromozomi de hamster, intră în stare extinsă în metafază şi fără a avea completată sinteza ADN-ului. Proteinele condiţionează în esenţă contracţia cromozomului, iar replicaţia completă devine o condiţie a ansamblării ADN-ului cu proteinele bazice şi a condensării.

Sub influenţa diferiţilor agenţi este afectată spiralizarea cromozomilor. Astfel, în experienţe de tratare a nucleului în interfază cu arginină, cu proteine bazice sau prin reducerea pH-ului se determină inducerea unui aspect cromozomal asemănător profazei. Sub acţiunea colcemidului asupra nucleului profazic, apar segmente ce se replică tîrziu, incapabile de a se spiraliza normal.

Cînd asupra cromozomilor se acţionează cu poliamine şi feniletilalcool se înregistrează blocarea spiralizării anafazice. Cînd se acţionează cu citrat de sodiu are loc relaxarea spiralizării. În prima profază meiotică, clorurile de Na, K şi Ca, acţionînd asupra cromozomilor, determină o spiralizare anormală pe cînd sărurile de amoniu şi KCN determină nespiralizarea. Analogii bazelor azotate sau ai aminoacizilor precum 8 — azaguanina, 5 — fluorouracil, etionina şi p — fluorofenil-alanina determină nespiralizarea cromozomilor în diakineză. Actinomicina D, mitomicina C, 5 — fluorouracilul, etionina, p — fluorofenil-alanina şi 5 — metil-triptofanul determină, de asemenea, nespiralizarea cromozomilor în anafază, I — Colchicina determină supracontractarea cromozomilor.

3. MORFOLOGIA CROMOZOMILOR

Cromozomul este un organit cu morfologie dinamică, variabilă în diferite faze ale ciclului celular. El prezintă o anumită morfologie (nedetectabilă însă microscopooptic) în faza funcţională a ciclului celular (în interfază) şi o altă morfologie în faza transportoare a ciclului celular (în mitoză). Chiar în această ultimă fază, morfologia cromozomului este variabilă în funcţie de desfăşurarea ciclului de spiralizare şi despiralizare. Se admite că în echilibrul metafazic, cromozomul prezintă morfologia tipică, aflat fiind în faza de condensare şi de spiralizare maximă. Mai mult, în metafază, cromozomii se bucură şi de proprietatea constanţei morfologice, ceea ce face ca această fază să fie propice studierii morfologiei lor.

După dimensiunea lor, cromozomii pot fi mici, aşa cum apar unii cromozomi în complementul cromozomal la reptile şi păsări, sau aşa cum sînt unii cromozomi la grupe inferioare de nevertebrate şi la alge (Chlamydomonas) şi care se numesc microcromozomi; mari sau obişnuiţi, numiţi macrocromozomi, aşa cum apar cromozomii de Allium cepa, Trillium sp. (Fig. 17), Tulipa sp. etc., şi care pot fi observaţi cu uşurinţă la microscop. În afară de aceste două categorii de cromozomi s-a mai descris şi cromozomul uriaş sau politen, din celulele glandelor salivare de diptere, care are 1180 μ, fiind de aproximativ 157 de ori mai lungi decît cromozomii normali (1—30 μ). Cromozomul uriaş a fost descoperit de către Balbiani la 1881 la Chironomide şi descris de către Kostoff (1930) şi de către Painter (1933) la Drosophila melanogaster. El este format din 5 braţe lungi şi unul scurt, unite la nivelul unui cromocentru (Fig. 18). Braţele lungi sînt omoloage perechii I, II şi III de cromozomi din garnitura obişnuită de cromozomi de la D. melanogaster (2n = 8) (Fig. 19 a). Al şaselea braţ (cel mai scurt) este omologat cu perechea a IV-a de cromozomi, care cuprinde cei mai mici cromozomi din complementul normal diploid (Fig. 19 b). Cromozomii politeni se află în stare de conjugare somatică, fenomen de deo-

Fig. 17 — *Cromozomii din metafaza somatică la Trillium ovatum* prezintă regiuni alociclice evidenţiate prin tratament la rece (după I. Fukuda, din Stebbins, 1971).

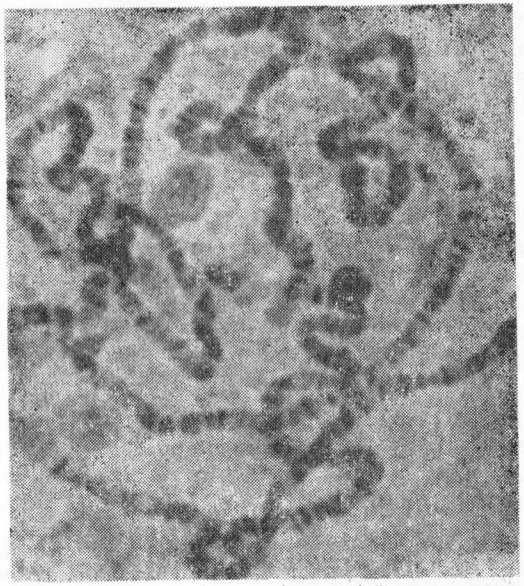


Fig. 18 — *Imaginea microscopică a cromozomului uriaş la Drosophila melanogaster (original).*

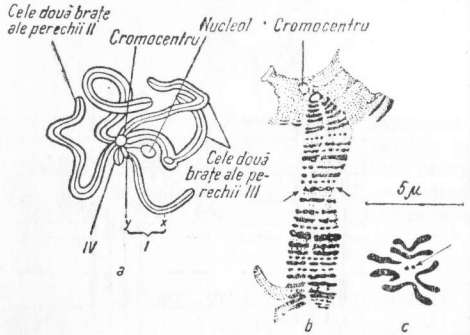


Fig. 19 a — *Corespondenţa dintre braţele cromozomului uriaş şi perechile de cromozomi din garnitura normală (2n = 8).* În dreapta, reprezentarea schematică a modelului de benzi clare şi întunecate şi complementul diploid de cromozomi (2n = 8).

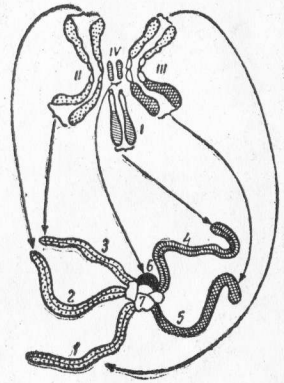


Fig. 19 b — *Relaţia dintre cromozomii din garnitura normală (2n = =8) şi braţele cromozomului uriaş din glandele salivare de Drosophila melanogaster* (din P. Raicu şi M. Nachtigal, 1969). *I—IV* — perechile de cromozomi obişnuiţi; *1* — *6* braţele cromozomului uriaş; *7* — cromocentru

sebită importanță în stabilirea legăturii dintre diviziunea mitotică și meiotică. Cromozomii uriași sînt formați din peste 5 000 benzi transversale clare și întunecate, cu o distribuție constantă pe brațele lor (Fig. 20). După Cassperson, benzile întunecate coincid cu zone bogate în ADN, pe cînd cele luminoase reprezintă zone sărace în ADN.

După Ris și Grous, zonele întunecate reprezintă zone în care cromatidele sînt răsucite și așezate perpendicular pe lungimea brațului, iar zonele clare reprezintă locurile în care cromatidele sînt nerăsucite și așezate paralel cu lungimea brațului. La cromozomul uriaș de drosofilă se remarcă faptul că, în anumite locuri, structura compactă a cromozomului se deslînează. Din aceste locuri pornesc lateral emergențe ca niște funde izolate care dau zonei aspect de umflătură de jur împrejurul cromozomului (Fig. 21). Acestea au fost numite „puffuri" sau inelele lui Balbiani (Fig. 22).

La cromozomul uriaș de drosofila, Plaut și Nash (citați din Lima-de-Faria, 1972) au constatat existența a circa 50 de repliconi — unități ce se replică independent.

Fig. 20 — *Cromozomi politeni de Chironomus în comparație cu cromozomii mitotici (dreapta sus). No* = nucleol; *Br* = inel Balbiani (după Beermann, 1961, din E. Grundmann, 1973).

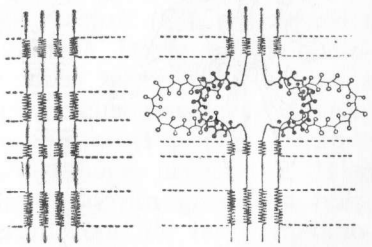


Fig. 21 — *Imaginea schematică a structurii fine a cromozomilor politeni.* Elementul de bază al fiecărei cromatide este o fibră neîntreruptă de ADN. Sînt reprezentate numai 4 din multele mii de cromatide. A doua cromomeră de sus (*) se găsește în starea de „puff", la nivelul căreia se desfășoară o intensă sinteză de ARN.

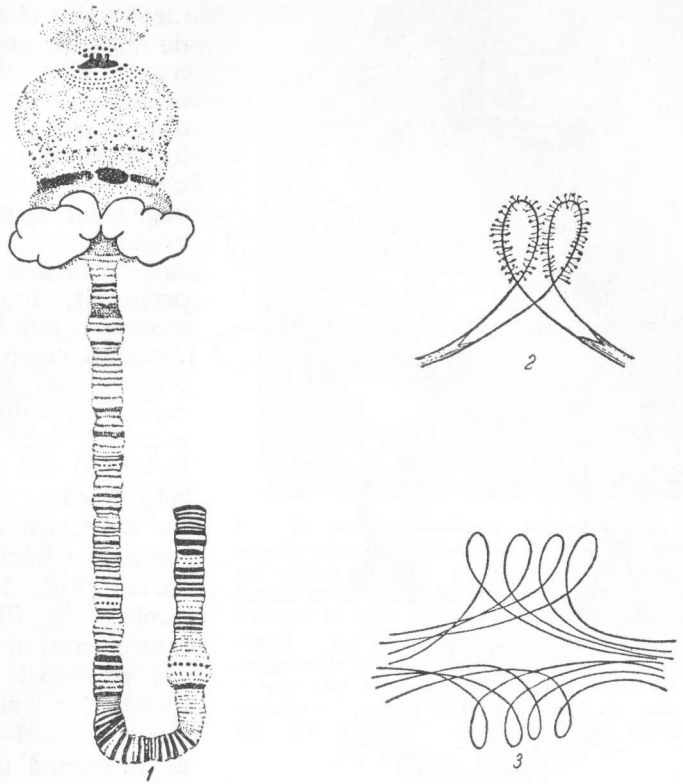


Fig. 22 — *Structura cromozomului politenic (uriaș) 1* — cromozomul politenic IV din glandele salivare de Bilobella matsakisi (după Cassagram); *2* — fibre cromonemice dintr-un inel Balbiani cu granule de ARN; *3* — reprezentarea schematică a fibrelor cromonemice din cromozomi și inelul Balbiani.

Un tip particular de cromozom este acela în formă de perie de sticlă de lampă adică cromozom „lampbrush" (Fig. 23). El a fost descoperit în ovocitele de triton, dar ulterior a fost evidențiat și în ovocitele altor vertebrate, în timpul profazei I a meiozei. Se pare că această categorie de cromozomi se întîlnește nu numai la ovogeneză ci și la spermatogeneză, nu numai la animale dar și la unele plante. Se pare că ei sînt legați, ca dealtfel și cromozomii uriași din glandele salivare de drosofila, de intense procese de sinteză organică. Aceste structuri cromozomale sînt legate de îndepli-

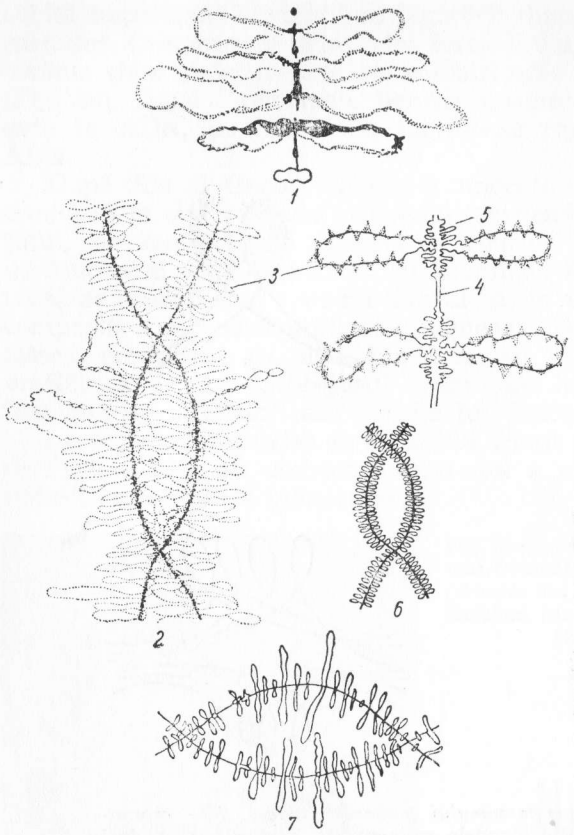


Fig. 23 — *Cromozom plumos (lampbrush) : 1* — un segment din cromozomul lampbrush; *2* — reprezentarea în detaliu a unui fragment de cromozom lampbrush; *3* — bucle laterale; *4* — cromatide; *5* — cromomere; *6—7* — bivalent cu două chiasme (din I. Steopoe, 1967, P. Raicu şi col. 1972, I. Drăcea, 1972).

nirea funcţiei ADN-ului de matriţă pentru sinteza ARN-ului. În embriogeneza timpurie, dezvoltarea organismului depinde de ARN-ul sintetizat în timpul ovogenezei. Spre sfîrşitul ovogenezei, ovocitele rămîn în faza de diploten prelungit, în care cromozomii, sub formă de bivalenţi, cresc enorm în dimensiune. Are loc emergenţa unui număr mare de bucle proiectate lateral din cromomerele fiecărei cromatide (se apreciază 20.000 de asemenea bucle la Triturus) (Fig. 24). Axele buclelor şi filamentele intercromozomale ale axei principale ale cromozomilor izolaţi pot fi lizate cu DN-ază, ceea ce înseamnă că atît în axa principală cît şi în buclele laterale se află ADN. Proteaza şi RN-aza nu au efect asupra acestora. Buclele sînt îmbrăcate într-o matrice de ribonucleoproteină sensibilă la RN-ază. Cromozomul lampbrush apare ca un substrat de intensă activitate genică. Ca şi cromozomii politeni, cromozomii lampbrush sînt sintetic activi în timpul cînd cromozomii sînt vizibili. Dar spre deosebire de cromozomii politeni, la care pufele apar doar la 2% dintre benzi, la cromozomii lampbrush, buclele apar la aproape toate cromomerele. Pe de altă parte, cromozomii politeni reprezintă nişte sisteme temporale nemairevenind la un sistem regulat şi nemaireproducîndu-se, pe cîtă vreme cromozomii lampbrush evoluează spre cromozomi regulaţi, căpătînd structură şi funcţii obişnuite prin regresarea tuturor buclelor, odată cu trecerea în diachineză.

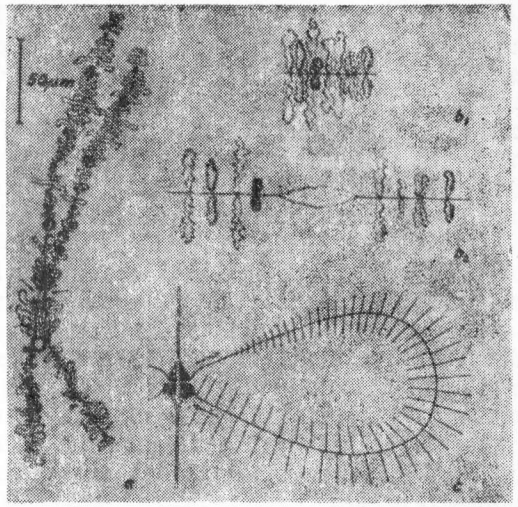


Fig. 24 — *Reprezentarea schematică a morfologiei cromozomilor lampbrush. a* — bivalent plumos într-un nucleu oocitic de Triturus cristatus. Săgeata indică cinetocorul. Se remarcă morfologia identică a buclelor la locii omologi, la ambii omologi împerecheaţi; b_1-b_2 supraextinderea unui cromozom lampbrush prin care se evidenţiază structura axei; *c* — model al unui cromomer format de bucle cu diviziune cvadripartită. Se remarcă axa fibrilară din ADN, parţial desfăşurată şi fibrile radiare (din O. Hess, 1973).

Cresterea sintezei ARN-ului în sistemul lampbrush se bazează pe mărirea numărului de matriţe de ADN ce controlează această sinteză. În nucleii ovocitelor cu cromozomi „lampbrush" se află un număr imens de „nucleoli", 1 000 la Triturus, 600—1.200 la Xenopus, datorită amplificării genice a regiunilor organizator nucleolare. Aceşti organizatori migrează prin membrana nucleară în citoplasmă, servind ca amorse pentru sinteza ARN-r. ADN-ul suplimentar format prin amplificarea regiunii organizator-nucleolare este metabolic stabil şi persistă în ovogeneză, în asociaţie cu nucleoli. Din această cauză conţinutul de ADN, la Xenopus de exemplu, creşte de la 4 C la 14 C. Aceşti „nucleoli" reprezintă molecule circulare de ADN care sînt asociate cu complexe ribonucleoproteice. Peste 97—99,5% din ARN-ul sintetizat în ovocitele cu cromozomi de tip lampbrush are caracter ribozomal.

În ovulele de Rana pipiens şi Xenopus laevis se află o cantitate de ADN de 300—500 ori mai mare decît cantitatea de ADN diploidă. Prin tehnica hibridării s-a stabilit că acest ADN nu este complementar decît cu o mică fracţie de ADN din ficatul acestor organisme. Se consideră că o mare parte din ADN-ul acestor ovule ar fi de origine mitocondrială.

Şi în spermatogeneză, la Drosophila hydei, cromozomul Y apare ca un cromozom univalent cu cinci bucle foarte mari, diferenţiate morfologic (Fig. 25). Buclele sînt active în producerea de ARN pentru sinteza proteinelor necesare în spermatogeneză, pentru producerea spermatozoizilor giganţi care se află la această specie. Proteinele sînt sintetizate înainte de formarea spermatidelor, deci înainte de repartizarea unidirecţională a cromozomului Y. Activitatea lampbrush a cromozomului Y precede diachineza. Buclele sale conţin ADN axial şi sintetizează activ ARN-ul. Buclele persistă 120 de ore. Spre sfîrşitul profazei I meiotice buclele cromozomului Y se condensează împreună cu tot cromozomul.

Cromozomii „lampbrush" ating lungimi de peste 800—1000 μm dar sînt foarte subţiri, aflîndu-se uneori la limita vizibilităţii microscopice. Structura lor este în esenţă o axă centrală pe care sînt plasate cromomerele. Din cromomere emerg ramificaţii laterale cu nişte perechi de bucle filiforme, de diferite dimensiuni de la o cromoméră la alta, dînd cromozomului aspect de perie de sticlă de lampă (Fig. 26).

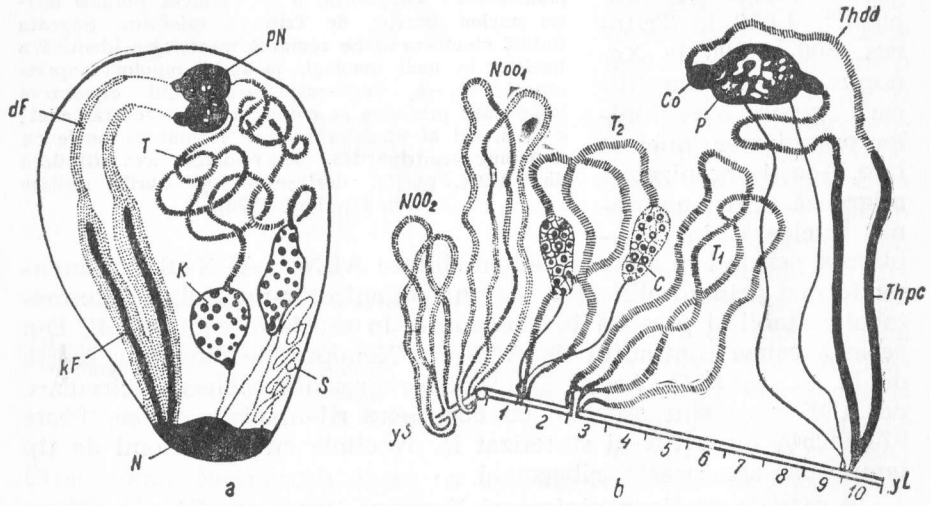


Fig. 25 — *Reprezentarea diagramatică a activităţii lampbrush a cromozomului Y, la Drosophila hydei. a* — (după Hennig, 1967) un nucleu intact al spermatocitului; *b* — (după Hess, 1967) modelele şi poziţiile buclelor pe braţul lung al univalentului Y; *C = K* = măciuci; *Co* = conurile pseudonucleului; *NOO2 = S* = noduri; *P = = PN* = pseudonucleu; *T*, T_2 = *T* = regiuni tubulare; *Thdd = dF* = secţiune difuză distală a filamentelor; *Thpc = kF* = secţiune compactă proximală a filamentelor (din B. John şi K. R. Lewis, 1969).

Pufele cromozomilor politeni de la Drosofilă şi ramificaţiile laterale ale cromozomilor lampbrush reprezintă locuri de sinteză a ARN, fapt demonstrat şi cu ajutorul actinomicinei D (un inhibitor specific al sintezei ARN-ului) în urma acţiunii căreia dispar aceste ramificaţii.

În endospermul de porumb şi în celulele antipode de mac s-au evidenţiat cromozomi de 10 ori mai lungi decît cromozomii obişnuiţi şi mult mai groşi. Serra interpretează aceşti cromozomi tot în termeni de politenie.

Semnificaţia acestor structuri cromozomale este legată de amplificarea genică. Numărul de copii ale genelor responsabile de sinteza ARN-ului variază considerabil la diferite specii de plante. Amplificarea genelor ARN-ribozomal apare în timpul dezvoltării ovocitelor şi a altor celule la amfibieni şi alte animale ca şi la plante. În timpul trecerii plantelor din stare dormindă în stare metabolic activă s-a constatat, folosindu-se metoda hibridării ADN — ARN — r, existenţa unei mari redundanţe a materialului genetic. Numărul de copii ale genelor ARN-r poate depăşi 13.000. Iată explicaţia:

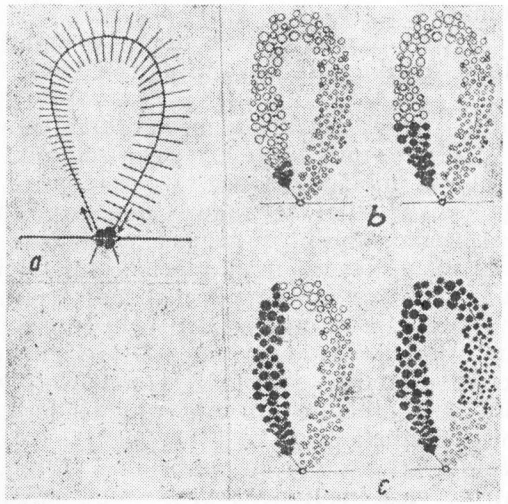


Fig. 26 — *Structura cromozomului lampbrush. a* — diagramă care arată structura cvadruplă a cromomerei lampbrush şi mişcarea buclei într-o direcţie polarizată; *b* şi *c* — marcarea secvenţială a buclei gigantice granulare pe cromozom după expunere la precursori ARN marcaţi (după Callan, 1963).

Fig. 27 — *Morfologia cromozomului B, la porumb:* petele mari reprezintă segmentul cromatic; cercul alb reprezintă centromerul (din I. Dăbală şi L. Gavrilă, 1971).

apariției acestor structuri cromozomale neobișnuite la plante și animale.

La unele organisme, plante și animale, în afara cromozomilor din complementul obișnuit, care s-au notat cu A, mai există și cromozomi accesorii, suplimentari sau supranumerari, care s-au notat cu B. Ei sînt de obicei heterocromatici. În general, cromozomii accesorii sînt acrocentrici sau telocentrici (Fig. 27). Cei care sînt metacentrici sînt în mod obișnuit izocromozomi, cu cele două brațe reprezentînd duplicația aceluiași braț, fiind omologe unul, altuia. S-au descris și cromozomi B submetacentrici. La Clarika, cromozomii B sînt eucromatici, prezentînd un oarecare grad de omologie cu cromozomii complementului normal. Uneori, ca la Crepis syriaca și Alopecurus pratensis, cromozomii B sînt mari și au constricții secundare nucleolare. Cromozomii B prezintă o densitate mai mare a ADN-ului pe unitatea de volum în comparație cu cromozomii A, datorită heterocromatinizării care se comportă alociclic în ceea ce privește spiralizarea. Cromozomii B se replică asincron față de cromozomii A, sintetizîndu-și ADN-ul numai în cursul ultimei jumătăți a perioadei de sinteză a ciclului mitotic, ceea ce este în concordanță cu natura heterocromatică a acestor cromozomi.

Cromozomii B se pot acumula prin nondisjuncție cromatidică, distribuție preferințială la unul din poli, în unii nuclei fii, și prin endomitoză.

La cromozomii obișnuiți ai complementului cromozomal normal, morfologia cromozomilor este determinată de plasarea regiunii centrice (centromer). De asemenea, morfologia acestor cromozomi este influențată și de prezența constricțiilor secundare. Prezența sateliților, la rîndul său, conferă cromozomului un aspect morfologic particular. Sateliții apar fie ca niște corpuri mici, sferice, unice, fie în perechi atașate de cromozom, la nivelul unei constricții secundare (ce funcționează ca regiune organizator nucleolară) prin intermediul unui filament subțire care este un segment din ADN cromozomal care codifică ARN-ribozomal. Satelitul terminal și constricțiile secundare ale cromozomului sînt asociate cu nucleolul, îndeplinind funcția specifică de organizator nucleolar.

La organismele ce prezintă cromozomi cu centromeri difuzi, nelocalizați, cu funcția centromerică insuficient precizată, morfologia cromozomului este mai dificil de apreciat, iar cromozomii nu pot fi clasificați decît folosind criteriul lungimii totale. Trebuie avut în vedere faptul că acești cromozomi cu centromeri difuzi se pot fragmenta relativ ușor și pot să dea naștere la cromozomi mai mici, ce pot avea un comportament normal în diviziune. Astfel se explică seriile mari, aneuploide sau heteroploide din familia Cyperaceae.

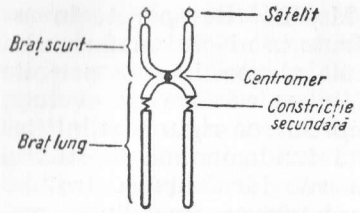


Fig. 28 — *Schema cromozomului uman* (după Patau, 1972).

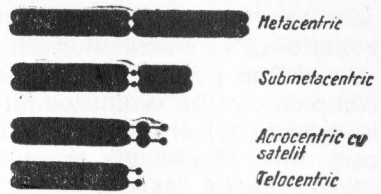


Fig. 29 — *Tipuri morfologice de cromozomi* (după Stebbins, 1971).

La organismele la care cromozomii au centromeri localizați, cromozomii pot fi clasificați morfologic în funcție de plasarea centromerului sau mai exact, așa cum recomandă Levan, după formulele $d = l - s$ sau $r = \frac{l}{s}$ în care:

d = diferența
r = raportul
l = lungimea brațului lung al cromozomului
s = lungimea brațului scurt al cromozomului (Fig. 28).

Cînd centromerul este plasat la un capăt al cromozomului (terminal) așa încît cromozomul are un singur braț, raportul brațelor $r = \infty$ și cromozomul se numește telocentric.

Cînd centromerul nu este plasat la capătul cromozomului ci în apropierea capătului cromozomului, adică într-o regiune terminală, încît se formează un braț foarte lung și un braț extrem de scurt, care este izodiametric, valoarea lui r este $7{,}0 - \infty$ și cromozomul se numește acrocentric.

Cînd centromerul este plasat mai aproape de un capăt al cromozomului decît de celălalt, încît se formează două brațe distinct inegale, dar diferența dintre lungimea brațelor este mult mai mică decît la cromozomii acrocentrici, raportul brațelor avînd valoarea $r = 3{,}0 - 7{,}0$, pentru poziția subterminală, și $r = 1{,}7 - 3{,}0$, pentru poziția submediană, cromozomii pot fi numiți subtelocentrici, respectiv submetacentrici.

Cînd centromerul este plasat în regiunea mediană ($r = 1{,}0 - 1{,}7$) sau chiar la mijlocul cromozomului — punct median — ($r = 1$), încît se formează, în primul caz, două brațe sensibil egale, și, în al doilea caz, două brațe perfect egale, cromozomul se numește metacentric (Fig. 29).

Studiul morfologiei cromozomilor, exactitatea aprecierii tipului lor morfologic este de mare importanță în studiul cariotipului unei specii date în care se dispun ordonat cromozomii speciei după numărul, forma, mărimea sau orice alt caracter specific pentru com-

plementul cromozomal al acestei specii. Modificările apărute în aspectul cariotipului reflectă modificări apărute la nivelul materialului genetic al cromozomilor. Studiul cariotipic al speciilor ne permite să stabilim gradul de înrudire al lor, căile pe care a mers evoluția complementului cromozomal. Iată de ce aprecierea riguros științifică a morfologiei cromozomilor este o cerință fundamentală în studiul cariotipic. Morfologia cromozomului cade sub incidența controlului genetic, altfel nu s-ar putea explica diferențele enorme dintre cromozomii obișnuiți și cromozomii uriași de la diptere, aflați în același organism.

În urma remanierilor cromozomale, cromozomii pot să-și modifice morfologia. Cromozomii telocentrici pot proveni din cromozomi metacentrici sau acrocentrici pe calea rupturilor în regiunile centromerice, urmate de o sinteză a materialului centromeric care face ca centromerul să-și recapete funcția inițială. Din fuzionarea a doi cromozomi telocentrici de dimensiuni egale poate lua naștere un cromozom metacentric. Asemenea rearanjamente cromozomale sînt frecvente în lumea animalelor. Inversiile paracentrice, pericentrice, duplicațiile, translocațiile, delețiile, pot modifica radical morfologia cromozomului și afecta în mod simțitor simetria sau asimetria cariotipului.

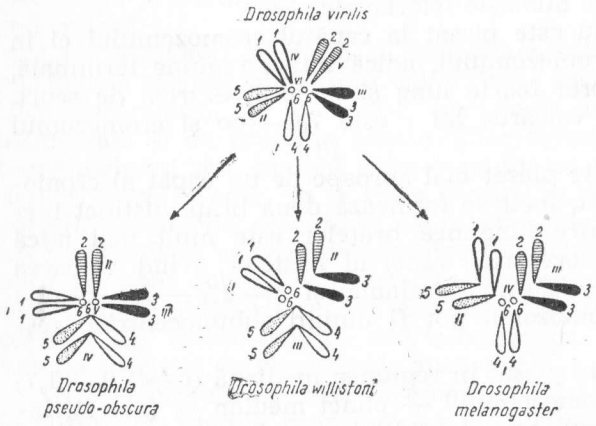


Fig. 30 — *Consecințele translocațiilor succesive în procesul de speciație în cadrul genului Drosophila. I, II, III, IV, V, VI* — Perechi de cromozomi la D. virilis; *1, 2, 3, 4, 5, 6* — Cromozomi care participă la formarea perechilor și între care au loc translocații succesive care duc la formarea noilor perechi de cromozomi la D. pseudo-obscura, D. willistoni și D. melanogaster (adaptat după Wharton, C. Petit și G, Prévost, 1969).

Mecanismele de translocație, de fuziune și fisiune centrică au dat serii robertsoniene cunoscute mai ales în cadrul evoluției genului Drosophila (Fig. 30).

Cariotipurile omogene, simetrice, sînt considerate în general ca fiind primitive, pe cînd cele heterogene, asimetrice, ca fiind specializate.

Numărul de cromozomi este o caracteristică de specie. Se deosebește un număr gametic de cromozomi, notat cu n, reprezentînd garnitura de cromozomi din gameți, de regulă haploidă, un număr somatic de cromozomi, notat cu 2 n, reprezentînd garnitura de cromozomi din celulele somatice, obișnuite ale corpului, care poate fi diploidă sau poliploidă, și un număr de bază de cromozomi, care reprezintă numărul de genoame (x) din garnitura de cromozomi a celulelor somatice. De exemplu, speciile diploide au 2 n = 2 x cromozomi, adică două genoame, pe cînd speciile poliploide au în celulele somatice un număr de cromozomi care reprezintă o multiplicare a numărului de bază x, putînd fi triploide = 3 x, tetraploide = 4 x, pentaploide = 5 x etc.

În garnitura normală, diploidă, de cromozomi, la speciile cu reproducere sexuată și cu determinism genetic al sexelor, cromozomii sînt de două feluri: cromozomi autozomi, comuni ambelor sexe și cromozomi heterozomi (gonozomi = alozomi) sau cromozomii de sex, specifici fiecărui sex. Dacă funcțional aceste două categorii de cromozomi sînt distincte, morfologic, mai ales la grupele la care dimorfismul sexual nu este accentuat (vertebrate inferioare), ele nu se deosebesc. Mai mult, chiar la organisme superioare, cu dimorfism sexuat accentuat, precum omul, cromozomul X, de sex, nu se deosebește de perechile de autozomi ai grupei C, din cariotipul uman (perechile 6—12). Dar deosebirile clare între autozomi și heterozomi apar la nivel molecular și se referă la particularitățile replicației materialului lor genetic.

Diferențele în morfologia cromozomului pot reflecta într-o măsură mai mare sau mai mică diferențele în conținutul genic, în aranjamentul genelor, fiind o sursă a variației genetice.

Cromozomul apare ca un organit flexibil care nu poate fi decelat între două diviziuni succesive cînd nucleul se află în stadiul metabolic, dar care, începînd din profază, cînd cromonemele se contractă și se condensează, poate fi remarcat în toate stadiile diviziunii pînă în telofază, cînd, prin fenomene opuse acelora din profază, adică prin decondensare și despiralizarea cromonemelor, el își pierde din nou identitatea microscopică.

Schimbările fizice ale cromozomului constau în parte din spiralizarea și îndoirea cromonemelor, care produc scurtarea cromozomilor din profaza mijlocie spre metafază, și despiralizare și decondensarea din telofază. Spiralizarea cromonemelor nu trebuie să fie suprapusă peste spiralizarea macromoleculelor de ADN deoarece cele două tipuri de spiralizări sînt de grade diferite de mărime. În ADN, fiecare gir are o lățime de 20 Å și pasul elicei sau distanța dintre doi giri succesivi este de 34 Å. Asemenea dimensiuni a macromoleculelor de ADN nu au putut fi evidențiate nici chiar la microscopul electronic, ci numai în difracție cu raze X.

Dar spiralizările cromonemelor au putut fi evidenţiate în cromozomii mari de Trillium sp., şi sînt de două dimensiuni: spire mici de 0,3 μm (3000 Å), deci de 100 ori mai mare decît amplitudinea spiralei de ADN, şi spire mai mari, de 2,5 μ (25.000 Å), care apar în metafază.

4. CROMOZOMUL ORGANIZATOR NUCLEOLAR

Unii cromozomi din garnitura de cromozomi purtători de sateliţi sau construcţii secundare au rolul de a reorganiza nucleolul la sfîrşitul diviziunii.

Nucleolul caracterizează majoritatea nucleelor eucariotelor, avînd formă şi dimensiune variabile în funcţie de stadiul dezvoltării individuale. De asemenea numărul nucleolilor este variabil în funcţie de specie, ţesut şi stadiu metabolic celular. De regulă ei dispar odată cu destrămarea membranei nucleare şi se refac în telofază persistînd în stadiul metabolic. La unele grupe de organisme inferioare, nucleolul nu numai că persistă în timpul diviziunii nucleare, dar joacă şi un rol determinant în diviziunea nucleară. Este cazul unor euglenoficee, aşa cum este Euglena clara. Interesant că în cadrul aceluiaşi grup de organisme sînt forme la care nucleolul se comportă după regula generală, dispărînd la începutul diviziunii şi refăcîndu-se pe seama unui cromozom organizator nucleolar (O. Donnell, 1965, L. Gavrilă, 1973).

În profaza timpurie, nucleolul apare a fi ataşat de o regiune anumită a unuia sau a mai multor cromozomi ai complementului cromozomal, regiune care a primit denumirea de organizator nucleolar (N. O.). Numărul de cromozomi N. O. corespunde în general numărului de nucleoli şi respectiv gradului de poliploidie. Regiunea organizator nucleolară apare, în profaza tîrzie şi în metafază, ca un filament subţire care leagă satelitul de restul cromozomului. Cromozomul organizator nucleolar este foarte încolăcit în interiorul nucleolului în interfază şi se scurtează prin contracţie cu trecerea spre profază devenind mai scurt şi puternic contractat în metafază. Paralel cu aceste modificări ale cromozomului organizator nucleolar are loc dezorganizarea nucleolului (Fig. 31).

La sfîrşitul profazei, nucleolul se micşorează în volum, se separă de cromozom şi dispare în citoplasmă. El se va forma în telofază, în acelaşi loc, pe cromozomul organizator nucleolar (Swanson, 1963). Regiunile organizatorului nucleolar (N.O.) sînt asociate cu zone

heteropicnotice. Regiunile N.O. sînt deci regiuni alociclice sau heterocromatice avînd o singură funcţie şi anume aceea de organizator nucleolar. Analiza genetică şi microautoradiografia au demonstrat că cel puţin ARN-ul nucleolar este transcris la nivelul genelor localizate în regiunea organizatorului nucleolar.

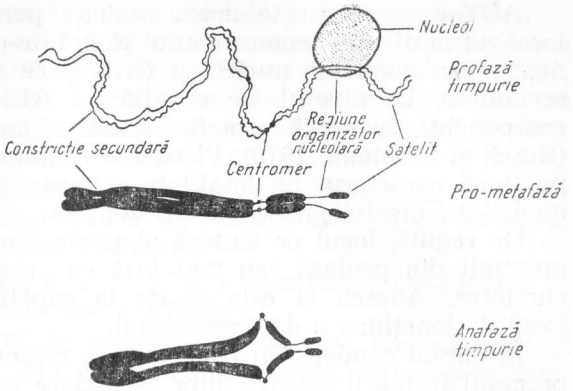


Fig. 31 — *Evoluţia cromozomului în cursul mitozei* (după Stebbins, 1971).

La plantele superioare s-a demonstrat existenţa unei competiţii pentru organizarea nucleolului, în cazul cînd sînt mai mulţi cromozomi N.O. deoarece multe gene sau poate majoritatea genelor sînt legate de activitatea ARN-polimerazei. Navaşin a arătat că specia Crepis capilarris posedă un cromozom organizator nucleolar mai puternic care îl anihilează pe cel de la C. alpina, C. neglecta, C. tectorum şi C. dioscorides, în cazul hidridării dintre aceste specii, dar la rîndul său este anihilat de cromozomul organizator al nucleului de la C. parviflora (Swanson, 1963).

Reorganizarea nucleolului se poate realiza la capătul cromozomului N.O sau la locul de joncţiune a doi cromozomi. O mutantă de Xenopus care a pierdut nucleolul este letală în stare homozigotă, ceea ce indică faptul că nucleolul este esenţial pentru dezvoltarea normală a organismului. În condiţie heterozigotă, organismele supravieţuiesc, dar celulele sînt deficiente în ribozomi.

Se trage concluzia că nucleolii sînt în cea mai mare măsură responsabili pentru sinteza ribozomilor (Stebbins, 1971).

Heitz arată că numai regiuni specifice din cromozomii organizatori nucleolari, aparent „lipsite de ADN", numite regiuni SAT (sine acido thymonucleico), sînt legate de organizarea nucleolară. Aceste regiuni nu sînt însă lipsite de ADN, ele fiind regiuni ce se suprapun constricţiilor secundare cromozomale. McClintock a stabilit că aceste regiuni sînt, la mutantele de porumb, atît în legătură cu numărul cît şi cu tipul de nucleoli. Deleţia acestor regiuni, la unele mutante de porumb, are caracter letal în stare homozigotă sau duce la scăderea numărului de nucleoli sau la dereglări ale funcţiei şi structurii acestora, în stare heterozigotă, aşa cum s-a remarcat la Xenopus.

ADN-ul ce servește drept matriță pentru sinteza ARN-r este localizat la nivelul cromozomului N.O, într-o anumită regiune, regiunea organizatorului nucleolar (NOR), ce corespunde constricțiilor secundare. La nivelul lor se află un ADN-r care, alături de alți componenți, în speță proteine speciale, controlează sinteza ARN-r (Busch și Smetana, 1970). Pierderea regiunilor organizator nucleolar pe lîngă caracterul de letalitate asupra organismului determină și modificări morfologice ale cromozomilor.

De regulă, locul de sinteză al nucleolilor este identificat în cromozomii din profază sau metafază ca „constricții cromozomale secundare". Adesea el este situat la capătul cromozomului sau la locul de joncțiune a doi cromozomi.

În cursul condensării progresive a cromozomilor N.O în profază, procesul formării constricțiilor secundare poate fi văzut ca o oprire a condensării acestor regiuni legate de nucleol. Unii cromozomi cu sateliți prezintă o constricție secundară lungă între corpul cromozomului și satelit. Numărul de nucleoli este în parte corelat cu numărul de constricții secundare din cromozomi. Poziția regiunii organizator nucleolare este variabilă între constricția primară (centromer) și capetele cromozomului. La om, cromozomii din perechile 13, 14, 15, 21 și 22 îndeplinesc funcție de N.O, fiind asociați cu nucleoli.

La Gallus domesticus, Ohno și colaboratorii au arătat că există un număr de circa 12 microcromozomi asociați cu nucleolul. La Chironomus tentans, fiecare cromozom poate fi asociat cu un nucleol cu excepția cromozomului I.

Cercetările privind locusul „bobbed" de la Drosophila au arătat că mutația acestuia determină scurtarea perișorilor tegumentari. Acest locus se află pe cromozomul de sex, în, sau aproape de regiunea organizator nucleolar. Prin tehnica hibridării ADN-ului s-a demonstrat că mutantele „bobbed" au mai puțin ARN-r decît musculițele normale, mutanta fiind deficientă în parte pentru regiunea N.O, ADN-ul din această regiune codificînd ARN-r. Acest ARN-r se află mai întîi în nucleol, de unde este eliberat în citoplasmă, nucleolii fiind locul de sinteză pentru proteinele ribonucleare și locul de formare a ribozomilor. În citoplasmă ribozomii se complexează cu ARN-m, participînd la sinteza proteică. Nucleolii prin creștere și multiplicare pot servi ca amplificatori ai sintezei proteice la eucariote, lucru care nu se poate întîmpla la procariote, la care sinteza proteică prin translație se realizează cu o intensitate constantă, creșterea ei fiind condiționată de creșterea complexelor poliribozomi — ARN-m.

În timpul creșterii active a celulelor inițiale ale meiocitelor, nucleolii sînt mari și condiționează o sinteză crescută de proteine.

De asemenea, în ovogeneză, la multe animale ca și în timpul germinării seminţelor la plante, s-a remarcat fenomenul amplificării genice prin care gena responsabilă de sinteza ARN-r, plasată în zona N.O, este amplificată de un număr foarte mare de ori, determinînd sinteze intense de substanţe macromoleculare, necesare desfășurării diviziunii.

Se pare că nucleolii intervin în sinteza ADN-ului, deoarece iradierea nucleolilor cu doze înalte de radiații face să fie atenuată sinteza ADN-ului, fără însă a o elimina.

La formele homozigote pentru deleția constricției secundare, în loc de nucleoli apar granule mici nucleolare.

În nucleol se află ADN, în proporție de 5—10% din masa totală a nucleolului. Regiunile N.O. conțin gene operatoare necesare pentru activitatea genelor structurale ce controlează sinteza de ARN-r sau regiuni ce conțin ADN-r ce codifică ARN-r. La numeroase plante a fost evidențiată la nivelul nucleolilor o structură filamentoasă. La Cour și colaboratorii (1970) au demonstrat că nucleolonemata reprezintă „bucle" de origine cromozomală și este locul de sinteză a ADN-ului „nucleolar".

Pufele cromozomilor uriași și buclele cromozomilor lampbrush sînt legate de producerea dezoxiribozo- și ribozo-proteinelor și sînt asociate cu nucleoli.

La Drosophila peninsularis s-a evidențiat, în celulele glandelor salivare, existența unui ADN nucleolar. După Barr și Plaut există diferențe în dispoziția acestui ADN-nucleolar, de la microzone, la mase extinse și asociații fibrilare (Busch și Smetana, 1970). El se continuă cu ADN-ul din cromozomi. Altman a arătat de asemenea penetrația de cromatină perinucleolară în nucleol și că sinteza ADN-ului se face simultan în cele două zone.

De asemenea, s-a arătat că ADN-ul din pufe și nucleoli se continuă cu ADN-ul din cromozomi. Evidența pătrunderii ADN-ului din cromatina perinucleolară în nucleol a fost stabilită prin studii la microscopul optic efectuate la Spirogyra, de către O'Donell ca și de Walker în tumori (Busch și Smetana, 1970).

Studiind încorporarea citidinei H^3, H. Kihlman (1966) a arătat că sinteza ARN în timpul telofazei este localizată exclusiv în corpurile prenucleolare. Sinteza ARN-ului nu se poate realiza atunci cînd cromozomii sînt în condensare meta-anafazică.

Fără locusul ce controlează organizarea nucleolară de pe cromozomul 6, de la porumb, materialul matrice nucleolar rămîne dezorganizat.

Sinteza ADN-ului nucleolar are loc independent de aceea a ARN-ului cromozomal, desfășurîndu-se în celulele glandelor salivare de Drosofilă, cu o viteză mult mai mare decît în cromozomi.

În genomul celular se află numeroase locuri de sinteză a ARN-ului, inclusiv regiunea N.O. Nucleolul apare ca principal loc de sinteză a ARN-r. Acest lucru este demonstrat de absența sintezei ARN-r (ARN cu fracțiile 18S și 28S) în celulele anucleolate de Xenopus. Există de asemenea o proporție definită între ARN-r, ADN și numărul organizatorilor nucleolari. Implicarea nucleolului în sinteza ARN-r se bazează pe similitudinea raportului bazelor din ARN nucleolar și ARN-ul ce predomină în ribozomii citoplasmatici.

Prin autoradiografie s-a constatat că Mg^{2+}, ce activează reacția ARN-polimerazei, responsabilă pentru sinteza ARN ribozomal, apare în primul rînd în nucleol. Prin contrast Maul și Hamilton au constatat că Mn^{2+} $(NH_4)_2SO_4$– ce activează ARN-polimeraza, care catalizează sinteza unui ARN ce se aseamănă cu ADN, apare în cromozomi în regiuni extranucleolare.

Prin tehnica hibridării ADN-ARN s-a constatat că circa 0,3% din genom este complementar cu ARN-r și că acest ADN complementar ARN-r este limitat la nivelul regiunii organizatorului nucleolar. Organizatorul nucleolar implică cîteva mii de loci genici înlănțuiți care sînt probabil transcriși ca o unitate.

În cazul mutantei recesive de la Xenopus laevis, în care nu se formează nucleolul normal în stare homozigotă, se sintetizează o oarecare cantitate de ADN și ARN de tip 4 S, dar nu se poate sintetiza ARN-r, 28 S și 18 S, așa încît nu se formează ribozomi. Mutanta a pierdut cistronii ribozomali, deși este normală în ceea ce privește fracțiunile de ARN neribozomal. Capacitatea de a sintetiza ADN este caracteristică nucleilor care au integritate nucleolară. Funcția primară a nucleolului apare însă a fi producerea de ribozomi, fapt susținut de absența acesteia în timpul fenomenelor distributive din mitoză.

Observațiile lui McClintock, după care materialul difuz nucleolar, la formele cu organizatorul nucleolar distrus, se formează în mai multe locuri sau lipsește, ar fi o indicație a faptului că organizatorul nucleolar și locurile de sinteză a ARN de pe cromozomi nu funcționează în completă independență, deși ele sînt implicate în sinteza de ARN de diferite tipuri. ARN-ul cromozomal are un conținut mai ridicat în adenină decît ARN-nucleolar. În timpul profazei, materialul nucleolar este transferat cromozomilor.

McClintock studiind translocația reciprocă între cromozomii 6 și 9 la Zea mays a demonstrat natura complexă a elementului organizator nucleolar. Un interschimb 6^9 și 9^6 apare în urma fragmentării cromozomului 6 la nivelul organizatorului nucleolar și face ca fiecare din cromozomii implicați în translocație să participe la organizarea nucleolului. Pe această cale, un complement cromozomal haploid poate avea 2-n cromozomi organizatori nucleolari. S-a demonstrat că ADN-ul localizat în regiunea organizator nucleolară reprezintă cistronii, care au codificată informația necesară sintezei ARN-r de tip 18 S și 28 S.

La Pisum s-a evidențiat un caz unic, în care nucleolii pot fi organizați direct din centromeri și, în acest caz, toți cromozomii iau parte la organizarea nucleolului.

La porumb regiunea organizator nucleolară prezintă o regiune proximală reprezentată de o masă amorfă cu unele elemente granulare.

La Chironomide, s-a evidențiat, în regiunile organizator nucleolar, prezența unor fibre de 100 Å, care reprezintă agregate de ADN funcționale în biosinteza elementelor nucleolare.

Prin endoreduplicație are loc o creștere mare a numărului de nucleoli. Pufele — inelele lui Balbiani — sînt legate ca și buclele lampbrush, de activitatea sintetică ribonucleoproteică. În ovocitele amfibiene se remarcă o amplificare remarcabilă a genelor nucleolare. Unii nucleoli, împreună cu o anumită fracțiune de ADN, trec în citoplasmă, controlînd direct sinteza proteică în cazul cînd aceasta trebuie intensificată.

Capitolul III

BIOCHIMIA CROMOZOMULUI

1. COMPOZIȚIA CHIMICĂ A CROMATINEI

La eucariote substanța de bază a cromozomului este reprezentată de un complex nucleoproteic format din ADN și proteină.

După datele prezentate de Stebbins (1971) în tabelul nr. 1 rezultă că în cromatină se află mai multă proteină decît ADN.

TABELUL Nr. 1

Compoziția chimică a cromatinei (după Bonner și alții, din Stebbins, 1971)

Sursa	ADN %	Histone %	Proteine nehistone	ARN %	ADN activ în transcripție %
Embrioni de mazăre	39,0	40,0	11,0	10,0	12
Mugure vegetativ de mazăre	40,0	52,0	4,0	4,0	6
Cotiledon în creștere de mazăre	43,5	34,5	16,0	6,0	32
Ficat de șobolan	37,0	37,0	25,0	1,0	20
Timus de vițel	40,2	46,0	13,5	0,3	15
Blastulă de arici de mare	39,0	41,0	19,0	1,0	10
Larva (pluteus) de arici de mare	33,4	29,0	35,0	2,6	20

Histonele sînt proteine bazice în al căror lanț polipeptidic abundă fie arginina, fie lizina, fie ambii aminoacizi. În spermatozoizi și bacterii, în loc de histone se află o altă categorie de proteine bazice numite protamine. Proteinele nehistonice sînt în cea mai mare parte proteine acide, de natura colagenului. Se constată că dintre proteinele nucleare, doar proteinele bazice, în speță histonele, se complexează cu acizii nucleici, la eucariote, spre deosebire de procariote, unde asemenea asociere nu are loc, iar unele proteine nehistonice intervin în procesele de replicare a ADN-ului și de transcripție a ARN-ului, fiind deci substanțe macromoleculare cu rol enzimatic.

Asocierea ADN-histonă influențează temperatura de denaturare a ADN-ului (desfacerea ADN-ului în catene), aceasta fiind mai mare, arătînd rolul histonelor în conferirea stabilității structurii ADN-ului, respectiv a cromozomilor. Histonele, bogate în lizină, la mazăre, ridică temperatura de denaturare a ADN-ului de la 70 la 81°C, ceea ce nu realizează histonele sărace în lizină sau cele bogate în arginină. S-a dovedit experimental că histonele bogate în arginină pot inhiba sinteza ARN, pe cînd histonele bogate în lizină sînt mai puțin eficiente din acest punct de vedere. Din această cauză, în funcție de activitatea cromozomului, de activitatea genică (funcția autocatalitică și heterocatalitică a sa) dacă proteinele histonice sînt mai mult sau mai puțin constante în ciclul celular, proteinele nehistonice prezintă mari fluctuații în conținut. Trebuie remarcat de asemenea că dacă la procariote nu au putut fi evidențiate proteine histonice asociate cu ADN-ul, au fost totuși evidențiate proteinele nehistonice asociate genoforului, ceea ce indică faptul că, atît la procariote cît și la eucariote, mecanismele enzimatice ale funcției autocatalitice și heterocatalitice a genei rămîn universal valabile.

Prezența ADN-ului în cromozomi a fost evidențiată încă din anul 1924, de către R. Feulgen, folosind reactivul Schiff. Trebuie remarcat că în histochimie, orice reacție Feulgen-pozitivă este un indiciu al prezenței ADN-ului.

Cromatina mai conține în afară de ADN și proteine și cantități variabile de ARN (în faza G_1 și începutul fazei S se sintetizează un ARN cromozomal și proteine ce intervin în stabilirea vitezei

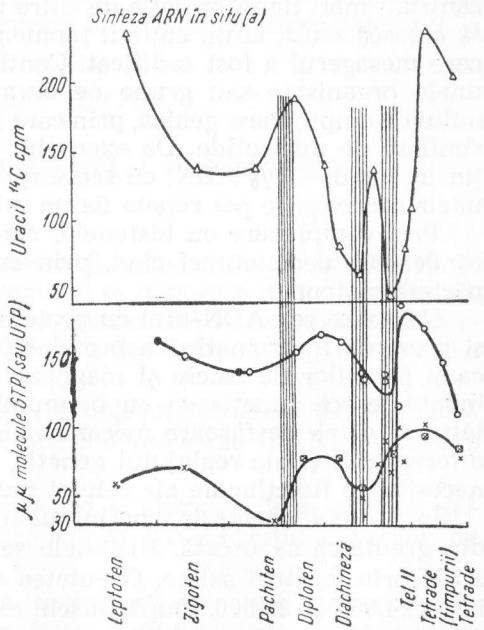


Fig. 32 — *Sinteza ARN-ului în timpul ciclului meiotic la Tulipa gesneriana* (după Hotta și Stern, 1965, din B. John și K. R. Lewis, 1969).

normale de replicare a ADN-ului — K. M. Jakob, 1972), lipide şi metale, în special calciu, magneziu şi fier. Sinteza ARN-ului în cursul ciclului meiotic prezintă maxime la începutul profazei şi sfîrşitul meiozei şi un minim metafazic (Fig. 32).

Se remarcă o creştere progresivă a cantităţii de ADN, începînd de la virusuri pînă la mamifere şi om. Astfel, la alga unicelulară Chlorella, cantitatea de ADN este de 12 ori mai mare decît la bacterii, dar reprezintă doar 1/16 din cantitatea de ADN de la Arabidopsis, care deţine cea mai scăzută cantitate de ADN dintre plantele cu flori. Apar însă variaţii foarte mari în cantitatea de ADN chiar în interiorul aceluiaşi grup de organisme, neconstituind excepţii de la regula creşterii cantităţii de ADN în corelaţie cu progresiva complexitate a structurii şi funcţiilor organismelor. Un conţinut mai mare de ADN indică prezenţa unui număr mai mare de gene active şi de aici o diversitate mai mare a funcţiei genice. Se poate însă ca organismele ce prezintă cantităţi mai mari de ADN nuclear să prezinte o redundanţă mai mare a materialului genetic şi o amplificare genică ridicată. Se realizează astfel o transcripţie simultană a unei cantităţi mari de informaţie de către un anumit ARN-m, ceea ce face să crească mult, la un anumit moment, rata sintezei proteice, pentru care mesagerul a fost codificat. Cantitatea mult crescută de ADN la unele organisme sau grupe de organisme apare în urma fenomenului de amplificare genică, prin care ADN-ul conţine multe secvenţe similare de nucleotide. De exemplu, nuclei din ficatul de viţel conţin în jur de 40% ADN, cu secvenţe ce se repetă de 10.000 ori, dar unele secvenţe se pot repeta de un milion de ori.

Prin complexare cu histonele, moleculele de ADN sînt mult mai condensate decît atunci cînd, prin degradare enzimatică, este îndepărtată histona.

Complexarea ADN-ului cu proteinele bazice din grupa histonelor şi prezenţa în cromatină a proteinelor nehistonice cu rol enzimatic, ca şi a ionilor de calciu şi magneziu, dă posibilitatea ca gena să-şi îndeplinească funcţia sa cu o anumită specificitate de la ţesut la ţesut şi să se desfăşoare mecanismele complexe şi precise ale citodiferenţierii şi ale reglajului genetic, în funcţie de caracteristicile şi necesităţile funcţionale ale celulei sau ţesutului.

În nucleul interfazic, conţinutul în ADN variază între 10 şi 30% din greutatea sa uscată. Histonele se ataşează la macromolecula de ADN prin legături saline. Greutatea moleculară a histonelor variază între 14.000 şi 20.000. După Busch, există peste 10 tipuri de histone. Aceasta sugerează posibilitatea ca funcţia complexului nucleohistonic să fie specifică pentru variatele tipuri de celule şi pentru diferitele stadii ale ciclului celular. Deoarece s-a găsit că modelul

de difracţie în raze X al complexului nucleohistonic nu diferă de acela al ADN-ului, s-a considerat că componenţa proteică a complexului nucleohistonic ar avea tot structură helicoidală. În cursul dezvoltării individuale, compoziţia părţii proteice a complexului nucleohistonic suferă modificări specifice.

Proteinele acide conţin acid aspartic, acid glutamic, leucină şi glicină în cantităţi notabile, prezentînd o compoziţie în aminoacizi asemănătoare cu aceea din proteinele ribozomale. După J. Dijkstra şi I. S. Weide (1972) proteinele nehistonice sînt variabile cantitativ şi au importanţă în restricţia expresiei genice.

ARN-ul nuclear cuprinde două categorii de ARN, cu viteză de sedimentare 45 S (unităţi Svedberg) şi cu viteză de sedimentare 32 S, a căror compoziţie în baze este asemănătoare cu aceea a ARN-r, ceea ce sugerează faptul că ARN-r poate fi sintetizat în nucleu, de unde trece în citoplasmă.

Tot în nucleu s-a mai descris prezenţa unui ARN (HS) heterogen care se presupune că ar fi precursor al ARN-m, căci prezintă un raport al bazelor asemănător ADN-ului, dimensiune variabilă (probabil, în funcţie de lungimea mesajului copiat) şi lipsa aparentă a structurii secundare.

2. ARHITECTURA MOLECULARĂ A CROMOZOMULUI

Deşi sînt bine cunoscute aceste date biochimice privitoare la compoziţia moleculară a cromozomilor se cunoaşte mai puţin despre modelul de structură moleculară a cromozomului, modelul arhitectural, de asamblare a componentelor moleculare, model care trebuie să fie în acord cu:

— prezenţa unui mare număr de molecule de ADN (la mamifere în fiecare nucleu se află 600.000 molecule de ADN, fiecare avînd 3,5 μm lungime);
— dispunerea liniară a genelor pe cromozom, gene care se găsesc o singură dată pe cromozom (cu excepţia cazurilor de amplificare genică);
— modalitatea de acţiune a cromatidei ca două subunităţi în replicaţie şi ca o singură unitate în procesul de crossing-over;
— stabilitatea structurii cromozomale şi dublarea cantităţii de ADN înainte de scindarea longitudinală a cromozomului, can-

titate ce va fi repartizată echilibrat cromozomilor fii. Totodată modelul molecular al cromozomului trebuie să fie în acord cu modificarea lungimii cromozomului în diferitele faze ale ciclului mitotic sau meiotic.

Un model de structură moleculară a cromozomului va trebui deci să țină cont de aceste date ale biochimiei, analizei genetice și citogeneticii.

Unul dintre modelele propuse de Taylor preconizează o structură a cromozomului care ține seamă de aceste date fiind conform cu comportamentul cromozomului în procesul de alungire și contractare, cu stabilitatea și replicația cromozomului. Potrivit acestui model (Fig. 33), cromozomul este format din numeroase molecule de ADN bicatenar legate cap la cap prin legături de tip 3′ și 5′.

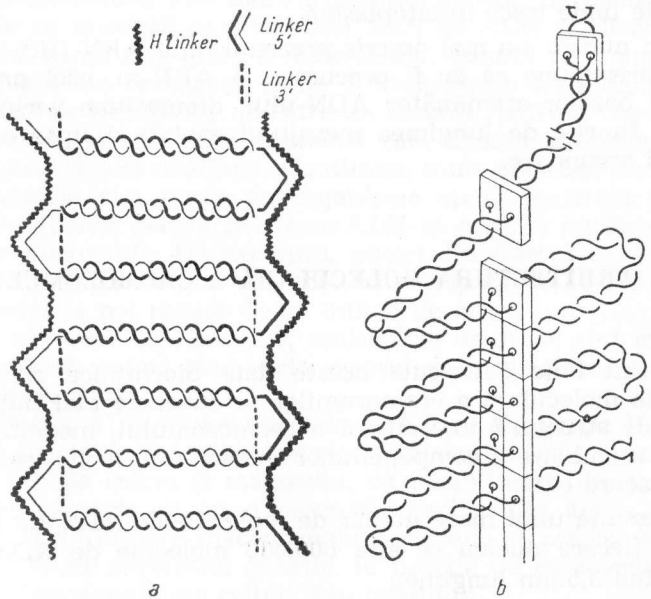


Fig. 33 — *Structura moleculară a cromozomului. a.* Modelul lui Taylor, (1963), prin care este interpretată structura moleculară a cromozomului. Moleculele de ADN sînt asamblate la nivelul cromozomului prin intermediul unor factori de legătură (linkeri); *b.* Modelul lui Taylor (1965) prin care este interpretată structura moleculară a cromozomului. Elementele proteice perechi formează axa cromozomului de care este prinsă dubla elice de ADN, lungă și neîntreruptă (din E. Peveling, 1968).

După acest model fiecare cromatidă cuprinde un număr mare de dublu-helixuri de ADN, așezate în tandem, legate prin resturi de fosfoserină la nivelul nucleotidelor terminale ale macromoleculelor de ADN (legături 3′), pe cînd legătura 5′ este reprezentată de punți difosforice.

Există și un al treilea tip de legătură între moleculele de ADN, de natură peptidică, probabil histonă (legături H), care conferă cromatidelor o structură stabilă, prin plierea moleculelor de ADN ca la o harmonică (Fig. 34); un astfel de model poate explica alungirea cromozomului în anumite faze ale ciclului celular ca și stabilitatea și posibilitatea sa de replicare. Un alt model este acela propus de Freese după care, legăturile peptidice sînt inserate între segmentele de ADN în direcție longitudinală (Fig. 35).

Mai există și modelul bazat pe dublul-helix Watson-Crick, după care cele două catene ale macromoleculei de ADN sînt legate prin punți de hidrogen, pozițiile acestor legături fiind puncte de rupere pentru inițierea

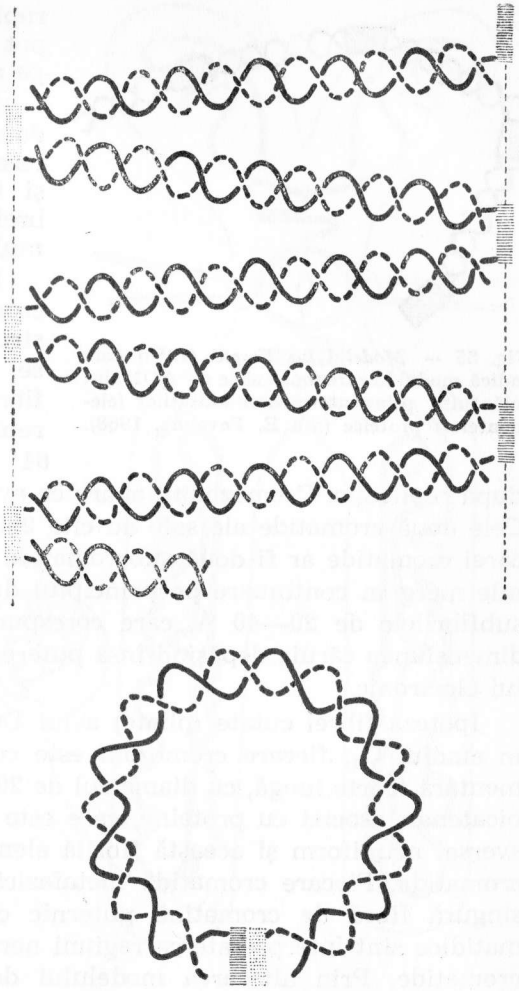


Fig. 34 — *Model de structură moleculară a cromatidei în care moleculele de ADN sînt plasate între două coloane,* cu o catenă a fiecărei molecule atașată de coloana din stînga și cu cealaltă catenă atașată de coloana din dreapta. Dreptunghiurile reprezintă materialul structural al coloanelor, linia întreruptă indică legături care pot include calciu. Cînd cromatidele devin vizibile coloanele se alătură așa încît structura apare așa cum se vede în partea de jos (după J. H. Taylor, 1958).

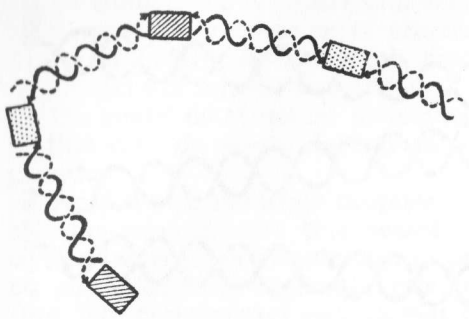


Fig. 35 — *Modelul lui Freese* (1958) care indică modul în care moleculele de ADN sînt înlănțuite prin intermediul unităților (elementelor) proteice (din E. Peveling, 1968).

replicației. Punctele de rupere pot fi numai pe o catenă sau pe ambele catene.

Actualmente se confruntă două ipoteze și anume ipoteza structurii multifibrilare și ipoteza monofibrilară a fibrei cutate (pliate) a cromozomului.

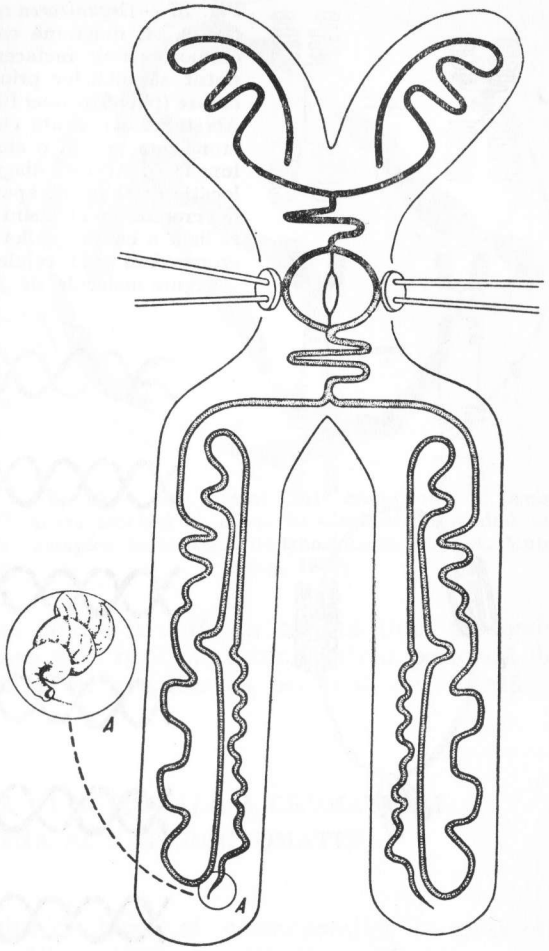
În concepția multifibrilară, cromozomii și cromatidele sînt structuri multifibrilare. Astfel, se admite existența a 32 de fibrile elementare înainte de replicație și respectiv a 64 de fibrile elementare după replicație. Cromozomul apare ca avînd un diametru de 4000 Å. Cele două cromatide ale sale au cîte 2000 Å fiecare. La nivelul fiecărei cromatide ar fi două subcromatide de cîte 1000 Å. Subdiviziunile merg în continuare pe principiul duplicității pînă se ajunge la subfibrilele de 20—40 Å, care corespund dublului helix de ADN, dimensiunea căruia depășind însă puterea de rezoluție a microscopului electronic.

Ipoteza fibrei cutate (pliate) a lui Du Praw (1970) consideră că, în stadiul G_1, fiecare cromozom este constituit dintr-o fibrilă elementară foarte lungă, cu diametrul de 200—250 Å, formată din ADN bicatenar, asociat cu proteine, care este cutată longitudinal și transversal neuniform și această fibrilă elementară pliată ar reprezenta cromatida. Fiecare cromatidă metafazică (Fig. 36) corespunde la o singură fibră de cromatină puternic cutată, iar fibrele intercromatidice sînt interpretate ca regiuni nereplicate, ale celor două cromatide. Prin alterarea modelului de pliere s-ar putea realiza trecerea de la cromozomul metacentric la cel acrocentric (Fig. 37 A și B) și nu prin cunoscutele mecanisme robertsoniene de fisiune (rupere) și fuziune (reunire) centrică.

Taylor (1958) a propus un model al structurii moleculare a cromozomului care are la bază un ax proteic dublu, pe care se atașează perpendicular moleculele de ADN, o catenă pe o axă proteică și cealaltă catenă pe axa proteică complementară (Fig. 38).

Aceste molecule de ADN funcționează ca repliconi (unități de replicație cu o relativă independență unele față de altele). Modelul este în acord cu replicația longitudinală a axei proteice și cu replicația de tip semiconservativ a moleculei de ADN. Prin separarea axei proteice și a catenelor de ADN există posibilitatea refacerii, în procesul de replicație, a catenelor complementare de ADN și a dublului ax proteic.

Mai sînt și alte modele de structură moleculară a cromozomului care și ele țin de domeniul ipotezei așa încît microscopia electronică n-a reușit să elucideze pînă acum problema structurii moleculare a cromozomului. Există după Du Praw (1970) și o organizare supracromozomală a materialului genetic, cromozomii neomologi fiind legați între ei prin fibre fine de ADN. Această idee a lui Du Praw se bazează pe existența inelului de translocație de



Fif. 36 — *Interpretarea ultrastructurii unui cromozom metafazic.* Fiecare cromatidă este formată dintr-o singură fibră repliată de un număr mare de ori. Replicarea care începe în numeroase puncte nu are loc încă în zona cinetocorului. La cinetocor sînt atașați microtubuli ai fusului de diviziune. În A interpretarea înrulării capătului fibrei (după Du Praw, 1970).

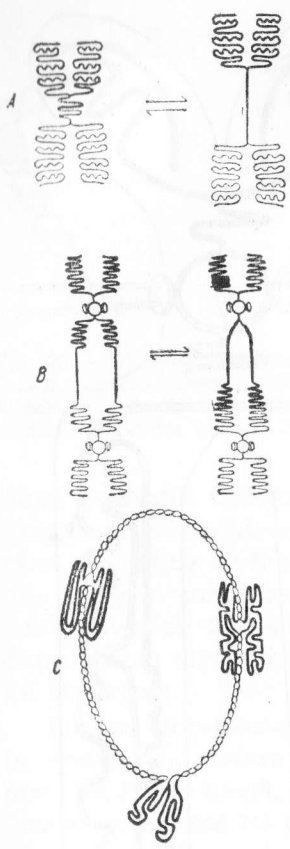


Fig. 37 — *Organizarea cromozomului după ipoteza DuPraw* (1970). *A.* diagramă care arată cum tranziţiile de la un cromozom unic metacentric cu asociere terminală ar fi putut să aibă loc prin simple schimbări în modelul de cutare (pliere) a unei fibre cromozomale lungi, continui. Aceste modele arată că aici poate fi mai mult decît un cromozom pentru o singură dublă helice de ADN, foarte lungă; *B.* Această diagramă arată cum un tip de translocaţie ar fi putut apare prin replierea fibrei la braţele a doi cromozomi care sînt asociaţi terminal; *C.* Configuraţia radială a cromozomilor poate presupune faptul că toţi cromozomii unei celule sînt conectaţi ca părţi ale unei singure molecule de ADN, circulară şi foarte lungă.

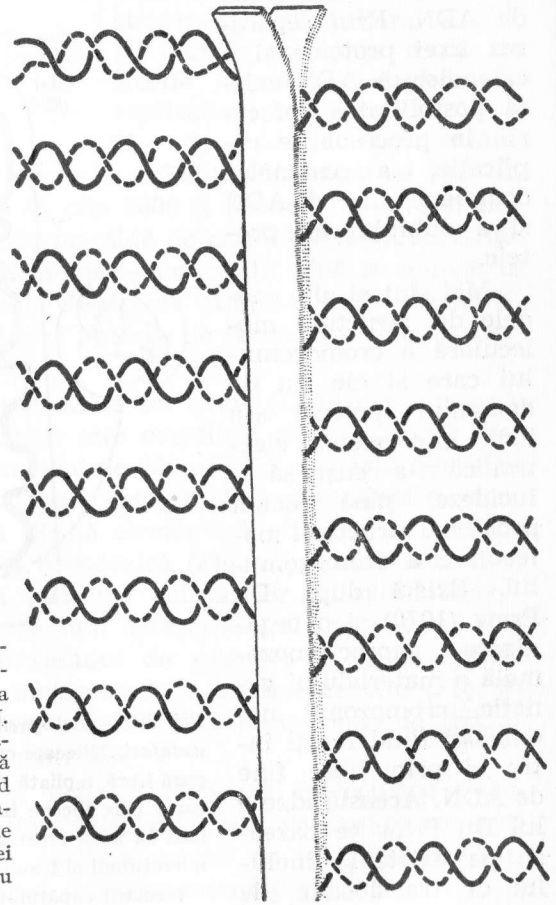


Fig. 38 — *Modelul panglicii* (Ribbon). Cromatida constă dintr-o coloană centrală dublu stratificată la care se ataşează moleculele de ADN. O catenă a fiecărei molecule se ataşează de stratul din faţă, cealaltă catenă de stratul din spate. Cînd cromatida se replică, panglica centrală clivează, separînd catenele de ADN. Fiecare jumătate a acestei structuri apoi îşi reface un nou partener (după Taylor, 1958).

la Oenothera, la care toţi cromozomii sînt fizic asociaţi (Fig. 39). Acest fapt i-a permis lui Du Praw să acrediteze ideea că mai mulţi cromozomi sau întreg setul haploid de cromozomi este alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN gigantică şi circulară, adică întreaga cantitate de ADN a unui nucleu este o singură moleculă circulară, gigantică, iar cromozomii ar apare ca nişte mărgele foarte apropiate una de alta, pe filamentul unic, supracromozomal reprezentat de macromolecula de ADN (Fig. 37 C). Acest model are ca sprijin replicarea tuturor cromozomilor unei celule o dată, în timpul unei perioade de sinteză, iar ADN-ul, care este replicat primul într-o perioadă de sinteză, se replică tot primul în următoarea perioadă de sinteză.

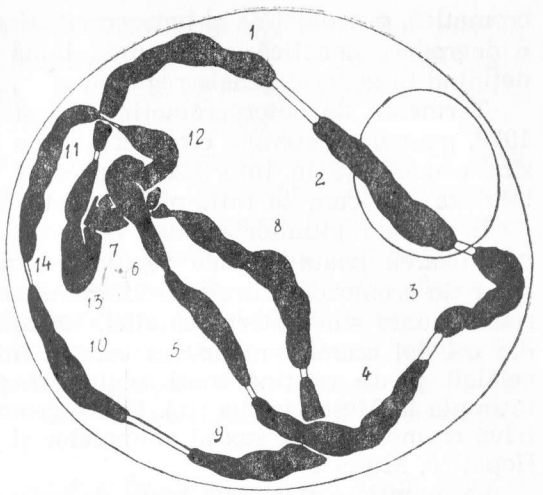


Fig. 39 — Inel format din14 cromozomi de Oenothera asociaţi şi aflaţi în diachineză, formînd un complex heterozigot de translocaţie (după A. Muntzing, 1967).

3. SPECIALIZAREA FUNCŢIONALĂ A CROMATINEI: EUCROMATINA ŞI HETEROCROMATINA

Cromatina — materialul de bază al cromozomilor — prezintă două tipuri de substanţe, diferenţiate nu atît din punct de vedere al compoziţiei cît mai ales din punct de vedere funcţional. Este vorba de eucromatină şi heterocromatină. O primă diferenţă între aceste categorii funcţionale de substanţă cromatică este aceea referitoare la proprietăţile de colorare: eucromatina se colorează doar în timpul diviziunii pe cînd heterocromatina se colorează pe parcursul întregului ciclu celular, deci şi în interfază. O altă diferenţă se referă la timpul de replicare, heterocromatina replicîndu-se de regulă mai tardiv.

Referitor la funcţia genetică a celor două categorii de substanţă

cromatică, eucromatina și heterocromatina, heterocromatina a suferit o degradare genetică, pierzînd în bună măsură genele structurale, deținînd în general genele reglatoare.

Termenul de heterocromatină a fost introdus de către Heitz, la 1928, pentru a desemna cromozomii sau regiunile cromozomale care sînt condensate în interfază și profază și nu se despiralizează în telofază, așa cum se întîmplă cu restul cromozomului.

În afara regiunilor acestea heterocromatice, limitate, heterocromatinizarea poate include regiuni extinse ale cromozomului sau chiar un cromozom întreg. Cromozomii suplimentari (B) de la numeroase plante sînt heterocromatici. La unele specii de animale, unul din cei doi cromozomi de sex este în întregime heterocromatic, iar celălalt poate conține mari regiuni heterocromatice (așa cum se întîmplă la Mesocricetus sp.). Heterocromatinizarea afectează deopotrivă cromozomii de sex ai animalelor și plantelor (Lychnis, Rumex, Hepatice, Musci etc.).

La mamifere sînt două feluri de heterocromatină:

— constitutivă, prezentă la ambii cromozomi omologi ai fiecărei perechi, în același loc;

— facultativă, rezultată din inactivarea unuia sau a doi cromozomi X la femele (mecanismul compensației de doză genetică prin care unul din cromozomii X de la femelă se heterocromatinizează, se inactivează pentru a compensa pierderea genelor de către cromozomul Y de la mascul, care, în cursul evoluției a suferit o continuă degradare genetică asigurîndu-se egalitatea în doza de gene la cele două sexe). Heterocromatina prezintă o stare condensată interfazică și profazică timpurie și se caracterizează prin alociclie sau replicarea tîrzie a ADN-ului său. Ciclul de condensare a cromozomilor numit euciclu are un minimum interfazic și un maxim meta-anafazic. Heterocromatina prezintă abateri de la acest ciclu, abateri care se numesc generic alocicluri. Alociclia caracterizează zonele heterocromatice puternic condensate și puternic colorate chiar în interfază și zonele heteropicnotice (subcondensate și slab colorate). Adesea pot avea loc conversii eucromatină — heterocromatină (B. John și K. R. Lewis, 1968). Heterocromatina de asemenea este implicată în inactivarea expresiei genice (A. I. Natarajan și G. Ahnström, 1969).

ADN-ul din zonele heterocromatice constitutive este compus dintr-o secvență repetată de polinucleotide și are funcții structurale, menținînd organizarea nucleară, protejînd regiuni vitale ale genomului, servind ca mecanism de împerechere timpurie în meioză, jucînd un anumit rol în speciație. Acest ADN, din zonele heterocromatice constitutive, s-a numit ADN satelit și el a fost decelat, în 1960, prin tehnica centrifugării în gradient de densitate. Este un ADN repetitiv-redundant, fiind ubicvitar la eucariote, de la protiste la om, reprezentînd 20—80% din genom.

Heterocromatina constitutivă este preferențial localizată în jurul centromerilor (Fig. 40) și organizatorilor nucleolari fiind substratul material al funcționării specifice a acestor regiuni. Regiunile heterocromatice concentrate în apropierea centromerului formează cromocentre proeminente sau „procromozomi", care sînt adesea în număr egal cu complementul cromozomal diploid. Alte zone heterocromatice sînt reprezentate de protuberanțe terminale și sateliți, iar heterocromatizarea în întregime a brațelor cromozomale sau a întregului cromozom este cel mai adesea asociată cu diferențierea sexului.

În regiunile heterocromatice, genele sînt mult mai strîns lincate, deoarece în aceste regiuni crossing-overul apare mult mai rar. Aceste gene sînt transmise ca o singură unitate mendeliană, ca o „supergenă" fiind activate sau inactivate simultan.

Heterocromatina este genetic represată în sensul că este incapabilă să sintetizeze ARN-m, dar regiunile heterocromatice afectează expresia genelor plasate în regiunile eucromatice adiacente și acest fenomen s-a numit efecte de poziție.

Heterocromatina constitutivă apare ca o masă condensată în nuclei interfazici pe întreaga perioadă de dezvoltare, inclusiv zigotul și gametogeneza. În fibroblaste apare ca două fibre

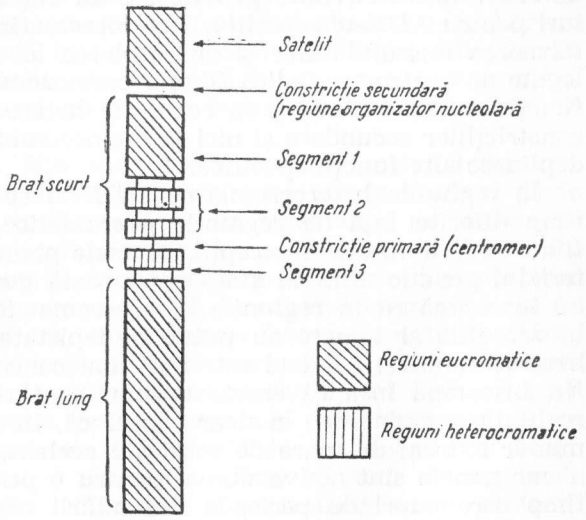


Fig. 40 — Reprezentarea schematică a regiunilor heterocromatice ale cromozomului M la Vicia faba, cu localizare pericentrică.

întinse; în leucocite apare ca două mase mari, difuze, compuse din fibre cu diferite grade de încolăcire; în celulele endoteliale ca două benzi, iar în neuroni ca două mase compacte numite cromocentri.

Heteropicnoza apare în profaza ovogoniei și caraterizează heterocromatina constitutivă, care determină un pronunțat polimorfism cromozomal. Arrighi și Hsu au elaborat metoda pentru evidențierea heterocromatinei constitutive, care permite o stabilire cu mare precizie a omologiei cromozomilor.

După un tratament alcalin cu NaOH, 0,07 N, timp de 1 minut, al celulelor *in situ* și încubare în soluție de citrat de sodiu, se realizează denaturarea ADN și parțiala renaturare (refacere a moleculelor dublu-catenare) în timpul incubației. Prin colorare cu soluție Giemsa se evidențiază zonele cu heterocromatină constitutivă. În populația umană a putut fi remarcată, după această tehnică, șapte variante de heterocromatinizare, ceea ce indică un polimorfism foarte accentuat. Heterocromatina este formată din ADN înalt repetitiv spre deosebire de ADN-ul din eucromatină în care secvențele de nucleotide sînt unice.

Semnificația heterocromatinei constitutive nu este pe deplin înțeleasă. S-ar putea ca zonele heterocromatice să nu includă gene active sau funcționale. Dar este greu de admis asemenea molecule de ADN fără activitate genetică. S-au sugerat însă numeroase roluri pentru ADN-ul repetitiv. Heterocromatina centromerică codifică formarea microtubulilor și ansamblarea lor în structurile fuzoriale legate de centromer, adică fibrele cromozomale ale fusului. Această funcție nu se extinde și la regiunile heterocromatice de la nivelul constricțiilor secundare și nici la cromozomul Y, care se pare că îndeplinesc alte funcții specifice.

În regiunile heterocromatice, ADN-ul se replică la perioade de timp diferite față de regiunile eucromatice, replicarea în general fiind tardivă cu unele excepții, la unele plante. Se admite că în materialul genetic aflat în stare condensată genele sînt inactive. Asta nu înseamnă că în regiunile heterocromatcie nu se află gene, căci la drosofila și tomate au putut fi depistate gene și în regiunile heterocromatice. ADN-ul este însă mai concentrat în aceste regiuni. Nu înseamnă însă că aceste regiuni conțin mai multe gene decît regiunile eucromatice ci doar faptul că, în aceste zone se află un număr extrem de mare de copii ale aceleiași gene. La multe organisme genele sînt active numai pentru o perioadă relativ scurtă de timp care cuprinde perioada dezvoltării organismului.

La mamifere încă din stadiile timpurii ale embriogenezei unul din cei doi cromozomi X de la femelă se heterocromatinizează. Asocierea acestei modificări cu inactivarea genelor este limpede în cazul

animalelor heterozigote pentru genele plasate pe X și care nu sînt sex-lincate (Stebbins, 1971). Cromozomii X sau zonele heterocromatinizate ale cromozomilor de sex apar în interfază ca un corpuscul intens colorat, lipit de membrana internă a nucleului, numindu-se cromatină sexuală sau corpuscul Barr, descoperit de către Barr și Bertram, în 1948. La pisică, blana de culoare „baga" există doar la femele. Masculii sînt fie negrii (B) fie galbeni (b). Femelele au structura genetică Bb, din care cauză blana reprezintă un amestec de păr negru și păr galben, datorită faptului că în unele celule a fost inactivat genetic cromozomul X, care purta gena B, pe cînd în altele a fost inactivat cromozomul X, care purta gena b. Heterocromatinizarea s-a făcut randomizat. Distribuția părului negru și galben în blana femelelor de pisică este în consecință randomizată. Cromozomul Y de la Drosofila și de la mamifere este în întregime heterocromatic, neconținînd gene care ar putea fi detectate prin teste de mutații, lincaj sau crossing-over. Mai mult, masculii ce pierd acest cromozom sînt normali fenotipic, pierzînd însă fertilitatea. Cromozomul Y joacă însă un rol esențial în spermatogeneză, care este dependentă de integritatea sa. Aceasta înseamnă că dacă în celelalte tipuri de celule, cromozomul Y este inactiv, în spermatocite el este activ, de unde rezultă că în aceste celule, el se eucromatinizează parțial. Reiese clar că cele două stări funcționale ale cromatinei, eucromatina și heterocromatina, nu sînt separate prin bariere absolute, că ele reprezintă într-adevăr, doar două stări diferite, din punct de vedere metabolic, ale materialului genetic — cromatina. Se admite că heterocromatinizarea este legată de funcții specifice ale represiei și activării genice.

La Planococcus citri, Nur a constatat că setul patern heterocromatic devine eucromatic în unele țesuturi iar aceste țesuturi devin mai sensibile la iradiere. Heterocromatinizarea este un mecanism de inactivare genică. Relocalizarea genelor pe segmente eucromatice la o poziție nouă, adiacentă segmentelor heterocromatice afectează funcția normală a acestor gene. Astfel, la capătul cromozomului 10 (K 10) la porumb se află un segment mare heterocromatic. La heterozigoții K_{10}/k_{10}, genele localizate pe cromozomul K_{10} suferă o segregare preferențială pe linia maternă iar markerii, cei mai apropiați segmentului heterocromatic, prezintă cea mai mare frecvență a segregării preferențiale, care este dependentă de crossing-overul dintre blocurile heterocromatice și centromer. Este afectată de asemenea frecvența chiasmelor. Prin hibridare și retroîncrucișare poate fi transferată heterocromatina difuză de la Nicotiana otophora la N. tabacum și acest transfer de heterocromatină poate determina fragmentări cromozomale spontane.

Un alt efect al heterocromatinei constitutive de la N. otophora este producerea de cromozomi excepţional de mari, megacromozomi, în unele celule, cromozomi care sînt de 15 ori mai lungi decît cei normali, dar care nu pot fi transmişi la celulele fiice, în mitoză. Diferenţele în gradul de condensare a heterocromatinei determină adesea variabilitatea hibrizilor interspecifici. Studii comparative au arătat că la formele la care există o cantitate mai mică de heterocromatină constitutivă (Nigella damascena); fragmentările cromozomale, apărute în urma iradierii, sînt mai reduse faţă de formele cu o cantitate mai mare de heterocromatină constitutivă (Vicia faba). Heterocromatina condiţionează desfăşurarea greşită a fenomenelor reparatorii, consecutive fragmentării, prin păstrarea deschisă a rupturii pentru un timp mai lung datorită întîrzierii replicării, permiţînd desfăşurarea schimbului reciproc între diferiţi cromozomi fragmentaţi. Heterocromatina constitutivă conţine elemente genetice necesare dacă ea devine eucromatină, în cursul oricărei faze a ciclului de viaţă cu excepţia replicaţiei şi a stadiilor meiotice şi mitotice.

Chiar dacă genele inactivate prin heterocromatinizare devin nefuncţionale în întreţinerea metabolismului ele pot suferi toate tipurile de mutaţie şi prin acest proces de heterocromatinizare se pot oferi organismului noi potenţialităţi de adaptare.

La Spiranthes sinensis, Tanaka a descris un complement cromozomal tipic 2n, format din 20h + 8he + 2e. Cariotipul derivat cel mai comun este 2n = 20h + 6he +4e. Cel mai avansat cariotip este 2n = 20h + 4he + 6e. Cromozomii „e" sînt în întregime eucromatici, cromozomii „h" au un braţ lung heterocromatic şi un segment mic eucromatic, la capătul distal, iar braţul scurt este eucromatic. Cromozomii „he" au un braţ lung cu un segment heterocromatic mic, proximal (lîngă centromer), şi un segment distal mare, eucromatic, pe cînd braţul scurt este eucromatic. Majoritatea clonelor de S. sinensis, din zonele reci, mlăştinoase, prezintă cariotipul standard. În zonele ierboase, clonele de S. sinensis au cariotip derivat, dar mai sînt şi forme cu cariotip standard cu frecvenţă mică. În zonele mlăştinoase calde, clonele au cariotipul cel mai evoluat. S-a constatat că atunci cînd numărul cromozomilor de tip „e" creşte, descreşte numărul cromozomilor de tip „he". Există o evidentă corelaţie între dimensiunea plantei şi cariotip. Cel mai evoluat cariotip se întîlneşte la plantele cu tulpinile cele mai lungi. La plantele cu trei cromozomi „e", cromozomul nepereche se împerechează în meioză cu un cromozom „he". Este deci o heterocromatinizare şi o trecere spre tipul eucromatic care procură unele avantaje selective şi adaptative speciei.

La eucariote, activitatea genică este reglată pe aceleaşi căi ca la procariote, deşi după McClintock multe din caracteristicile cromozomilor eucariotelor par a fi incompatibile cu modelele procariote. Cromozomii procariotelor şi probabil şi cei de la eucariote se bazează pe un singur dublu helix de ADN, dar la eucariote genomul total poate fi de 100—10.000 ori mai mare decît cel de la Escherichia coli. Circa 50% din ADN-ul eucariotelor reprezintă secvenţe „unice" care, prin metoda denaturării şi renaturării, s-a putut constata că sînt prezente doar o singură dată în genom.

Dacă aceste gene reprezintă gene structurale, aceasta înseamnă că conţinutul informaţional din celula mamiferelor este de 500 ori mai mare decît acela de la Escherichia coli. Haldane, Müller şi Ohno au arătat însă că o mare parte din ADN-ul eucariotelor nu este informaţional. La eucariote apar secvenţe repetitive de sute sau mii de ori, în ADN, a căror funcţie este încă necunoscută.

Pe cînd cromozomul bacterian constă în esenţă din ADN necomplexat cu histone, sau apare asociat cu o cantitate mică de proteine nehistonice, cromozomul eucariotelor conţine o cantitate aproximativ egală de ADN şi proteine bazice, formînd complexe permanente nucleohistonice. Asocierea histonelor cu ADN-ul determină formarea unei structuri compacte, supraspiralizate, structură care este relativ inactivă în sinteza ADN-ului. Pentru a avea loc transcripţia este necesară neutralizarea acestui efect al histonelor. Rolul neutralizator îl au proteinele nehistonice.

La cromozomii interfazici giganţi de diptere, o bandă împreună cu o interbandă formează un grup de complementaţie. Benzile întunecate conţin mari cantităţi de ADN şi histone, constînd probabil din nucleohistone superspiralizate. Benzile clare constau din nucleoproteine mai puţin spiralizate.

Modelul bandării este o caracteristică de specie dar nu şi de ţesut. Numai distribuţia structurilor difuze — a pufelor — este o caracteristică de ţesut. În afară de ADN şi histone, regiunea pufelor conţine proteine nehistonice şi ARN, fiind activă în sinteza ARN-ului. Regiunea fără pufe este mult mai puţin activă în sinteza ARN-ului, deşi nu s-a demonstrat dacă ea este complet inactivă. Ea conţine o mică cantitate de proteine nehistone şi ARN sau este lipsită de aceste componente.

Cromozomii lampbrush, din ovocite, au structură analoagă. Regiunile condensate, cromomerele, corespund benzilor cromozomilor politeni. În unele regiuni, buclele, analoage pufelor, pornesc ca nişte expansiuni din axa cromozomului. În aceste bucle are loc sinteza

ARN-ului. Buclele pleacă de la nivelul unor zone cromomerice.

Cromozomul, la organismele superioare, în speţă la mamifere, prezintă o structură bandată dar modelul acesta de benzi nu are nimic comun cu acela de la cromozomul politen. Metode adecvate permit obţinerea de modele de benzi care reflectă structura moleculară a cromozomului (Fig. 41). Pe baza acestui model de bandare (Fig. 42) se realizează o împerechere mult mai exactă a cromozomilor mitotici în vederea alcătuirii cariotipului. De asemenea, pot fi decelate cu o mai mare exactitate modificările structurale ale cromozomilor.

O bandă reprezintă porţiunea din cromozom care se distinge clar de segmentele adiacente prin aspectul luminos sau întunecos care apare în urma colorării după tehnici speciale. În alcătuirea hărţii cromozomale, benzile sînt redate prin linia lor centrală, nu prin marginile lor. Numerotarea regiunilor şi benzilor cromozomale se face pornind dinspre centromer spre telomer. Benzile sînt de mai multe feluri. În tehnica lui Caspersson şi colaboratorii, în care se foloseşte quinacrina mus-

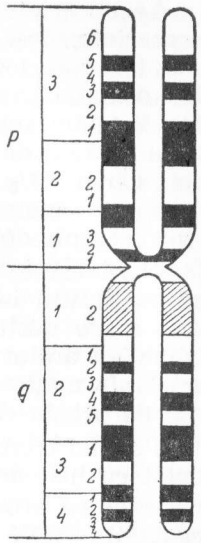


Fig. 41 — Numerotarea şi modelul benzilor pe cromozomul uman din perechea 1.

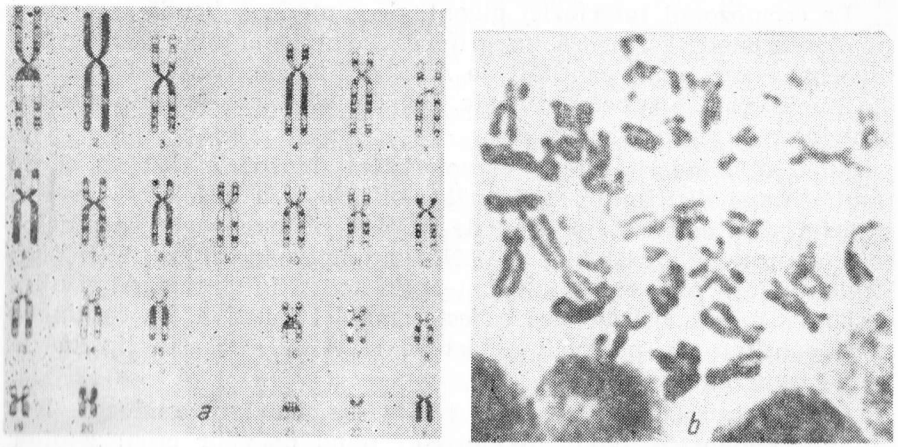


Fig. 42 — *Model de bandare pentru setul haploid de cromozomi umani* (*a*) şi cromozomii metafazici (*b*). *1—22* perechile de cromozomi autozomi *x, y* — cromozomi de sex. (*b*-microfotografie L. Gavrilă).

tard (QM) apar benzi „Q", fluorescente, întunecate (negative) sau strălucitoare (pozitive). Prin această tehnică se poate evidenţia, pe lîngă modelul fluorescent, specific fiecărui cromozom, şi cromozomul Y, în interfază. Prin tehnica lui Pardue şi Gall, 1970, reluată de Arrighi şi Hsu, 1971, se obţin benzi „C", adică se evidenţiază heterocromatina constitutivă folosind procedeul de denaturare-renaturare a ADN-ului. Se mai pot obţine şi alte tipuri de benzi, de exemplu benzi „G", cînd se foloseşte pentru colorare soluţie Giemsa (benzile G, corespund benzilor Q) benzi „R" etc.

Prin tehnica bandării s-a putut aprecia că heterocromatina, reprezintă mai curînd o stare a cromatinei, decît o substanţă diferită de eucromatină, căci partea din cromozom care manifestă însuşiri heterocromatice într-un tip de celule este eucromatică şi genetic activă în alt tip de celule, sau în alt stadiu al dezvoltării individuale. Reiese de aici semnificaţia majoră a fenomenelor de inactivare şi activare genetică în procesele de citodiferenţiere. Heterocromatina reprezintă porţiunea represată a genomului. Heterocromatina constitutivă este prezentă la ambii cromozomi omologi în cantitate egală şi distribuţie similiară. Ea conţine ADN, înalt repetitiv, inactiv transcripţional. Heterocromatina facultativă reprezintă rezultatul inactivării unuia din cei doi cromozomi X de la femela mamiferelor prin care se reduce numărul de cromozomi X funcţionali, la cîte unul pentru fiecare sex. Heterocromatina îşi replică tardiv ADN-ul. Blocuri mici de ADN satelitic (înalt repetitiv) pot fi intercalate în eucromatină, servind ca stocuri transcripţionale, locuri de iniţiere pentru polimerază, zone de ataşare de membrana nucleară, locuri de împerechere şi crossing-over etc. Şi heterocromatina cromozomului Y, la masculii mamiferelor, se replică tardiv, el neavînd gene mendeliene, dar conţine gene care condiţionează transformarea progonadei în gonadă.

Heterocromatina din cromozomii autozomi are de asemenea replicare tîrzie. În zonele permanent heterocromatice nu s-a putut stabili existenţa genelor mendeliene. Asocierile cromozomilor ce prezintă regiuni cu ADN satelitic sînt mult mai frecvente decît cele ale cromozomilor fără ADN satelitic.

În nucleii celulelor umane, asocierile cromozomilor satelitici din perechile 13, 14, 15, 21 şi 22 în mitoză sînt mult mai frecvente decît asocierile cromozomilor nesatelitici din perechile 1, 2, 3, 19 şi 20. ADN-ul satelitic se află localizat în apropierea centromerului şi a organizatorului nucleolar fiind o parte a heterocromatinei constitutive.

Prin modelul bandării se pot recunoaşte remanierile cromozomale care afectează omologia ancestrală a cromozomilor. Tehnica

bandării stă de asemenea la baza identificării cromozomului W, la sexul femel, heterogametic de la păsări și la stabilirea precisă a omologiei cromozomilor.

Cromozomii la eucariote au o structură caracteristică în care nucleoproteine strîns compacte (ADN-ul globular al lui Crick) alternează cu nucleoproteine mai puțin compacte, regiunile compacte fiind corespunzătoare cromomerelor iar cele mai puțin compacte pufelor sau buclelor, în cazul cromozomilor politenici și plumosi (lampbrush).

4. ROLUL HISTONELOR ÎN STRUCTURA ȘI FUNCȚIA CROMATINEI

Histonele sînt în general distribuite randomizat printre macromoleculele de ADN în cromatină dar, deoarece cromozomul nu este uniform ci prezintă un model caracteristic de benzi, se poate spune că regiunile compacte și difuze au structuri chimice diferite.

Deoarece nucleohistonele formează mase foarte condensate în condiții ionice similare cu acelea din nucleu, se admite că regiunile mai puțin condensate conțin histone modificate, ADN modificat sau alte substanțe care modifică conformația nucleohistonelor. Se admite că regiunile mai puțin compacte (zonele = benzile, mai clare) conțin o altă substanță decît histona care împiedică superspiralizarea caracteristică zonelor (benzilor) condensate. Prin degradare enzimatică s-a constatat că regiunile interbenzi sînt sensibile la pepsină. De asemenea, se consideră că fiecare regiune mai puțin compactă este caracterizată de o structură specială a ADN-ului.

În nucleohistone, pasul helicei este ceva mai mic decît în ADN-ul liber. Efectul histonei este de a micșora, de a strînge pasul helicei producînd supraspiralizarea neregulată de 100—120 Å diametru și supraspiralizări de grade mai înalte. Polianionii reduc răsucirea produsă de histone. Reducerea spiralizării de către polianioni se datorește faptului că ei se asociază cu ADN-ul pentru aceleași încărcături electrice, pentru care se asociază ADN-ul cu histonele. Efectul polianionilor va duce la creșterea generală a ionizării fosfaților în lanțul polinucleotidic. S-a demonstrat experimental că macromoleculele polianionice pot reduce superspiralizarea nucleoproteinelor.

Regiunile din genomul eucariotelor, ce trebuiesc transcrise, conțin elemente de control similare acelora de la bacterii. Mai mult, strîns legat de locusul promotor, fiecare regiune conține o configurație specifică („locus adress") la care o moleculă polianionică destabilizatoare, posibil o proteină nehistonă, se poate lega spre a determina o reducere a superspiralizării. Aceasta permite unei molecule de ARN-polimerază să acționeze ca promotor, pe cînd în nucleoproteina puternic superspiralizată acest lucru nu poate avea loc. Sistemele de control, asemănătoare sistemelor de control bacterian, operează în celulele eucariote după un model propus de J. Paul.

Dacă molecula de ARN-polimerază, se atașează la locul promotor, dar nu poate trece locusul reglator, va avea loc o despiralizare clară numai la nivelul unei regiuni foarte mici. Dacă molecula de polimerază reacționează din nou la locul de inițiere va determina o despiralizare a regiunii nucleohistonice compacte adiacente prin acumularea unui ARN legat de un polianion sau prin acumularea unui ARN legat de proteină.

Asemenea mecanisme pot explica apariția pufelor în cromozomii giganți, a buclelor în cromozomii lampbrush, a benzilor în cromozomul mamiferelor și ai altor organisme, a secvențelor de ADN repetitiv la eucariote („locus adress") și spiralelor strînse în cazul ADN-ului eucariotelor.

Capitolul IV

REPLICAREA CROMOZOMULUI

Funcţia esenţială a cromozomului este de a depozita, replica şi transmite informaţia genetică conţinută în gene de la o generaţie celulară la alta (Stebbins, 1971). Replicaţia genică precede diviziunea celulară. Singura excepţie de la această regulă apare la a doua diviziune meiotică, care nu este precedată de reproducerea cromatinei. Mai sînt şi alte cazuri cînd are loc o acumulare continuă de ADN, fără ca replicaţiile succesive să fie urmate de plasmodiereze. Această acumulare de ADN cu mult peste nivelul diploid creează premiza desfăşurării unor plasmodiereze succesive, care nu sînt precedate de fiecare dată de replicaţia ADN-ului. Asemenea evenimente se întîmplă de exemplu în sporii de la cianoficee, Nostocales, care prezintă garnituri hiperploide de cromatinozomi şi care prin plasmodiereze succesive dau naştere la celulele obişnuite ale unui trichom, cu garnitură normală de cromatinozomi (L. Gavrilă, 1973). Există şi celule poliploide care se pot divide fără sinteză prealabilă de ADN, dînd naştere la celule fiice, cu garnitură mai mică de cromozomi. În unele cazuri, cînd are loc diviziunea celulară fără o prealabilă dublare a cantităţii de ADN (celulele tumorale ascitice de şoarece, diploide, tratate cu 5 fluoro-uracil), celulele rezultate, deşi au număr normal de cromozomi, au cantitatea de ADN redusă la jumătate din care cauză funcţionează anormal, avînd redusă capacitatea de proliferare. Această reproducere a cromatinei presupune sinteza replicativă a ADN-ului şi a histonelor, care reprezintă constituenţii de bază ai cromozomului. La baza reproducerii (replicării) cromozomului stă principiul semiconservativ al replicaţiei (sintezei) ADN-ului, formîndu-se dintr-o cromatidă cîte două cromatide pentru fiecare cromozom.

Activitatea cromozomului este caracterizată prin trei stări diferite: autosintetică (autocatalitică), heterosintetică (heterocatalitică) şi nonsintetică. Funcţia autocatalitică caracterizează cromozomii aflaţi în celule cu proliferare activă. Funcţia heterocatalitică caracterizează în speţă cromozomii din celulele diferenţiate, implicate în producerea de molecule noi, specifice. Funcţia nonsintetică caracterizează cromozomii din celulele diferenţiate şi foarte specializate, fiind menţinute la un anumit nivel al activităţii metabolice.

Esenţa replicaţiei este distribuţia unui cod identic de informaţie genetică la fiecare celulă a corpului. Duplicarea cromozomului înseamnă producerea tuturor acelor molecule din care este alcătuit cromozomul şi care permit reglarea metabolismului său şi controlul activităţii sale mecanice în timpul ciclului celular (John şi Lewis, 1969). Cel mai important fenomen în replicarea cromozomului îl reprezintă indubitabil replicarea macromoleculelor de ADN. ADN-ul reprezintă singura moleculă autoreplicatoare cunoscută în celulă. Sinteza altor constituenţi ce intră în structura cromozomului depinde direct sau indirect de funcţia heterocatalitică a acestei molecule autoreplicatoare.

Înainte de începerea replicaţiei ADN-ului, în perioada G_1 a ciclului autosintetic şi la începutul fazei S, are loc sinteza unor proteine nucleare care intervin în iniţierea replicaţiei ADN-ului. În stadiul G_2 şi la începutul profaziei se sintetizează alte proteine implicate în spiralizarea cromozomilor. În G_1 şi începutul lui S sînt sintetizate proteine nucleare ce conţin arginina şi lizina. În timpul fazei S s-a constatat că are loc o migrare de proteine din citoplasmă în nucleu care, după Zetterberg, nu sînt cromozomale dar care induc sinteza ADN-ului, fapt demonstrat de experienţele lui Graham şi colaboratorii, care, transplantînd în citoplasma ovulului de Xenopus laevis nucleele unor celule adulte, deplin diferenţiate, din ficat, creier şi celule sanguine, aceste nuclee încetează ciclul heterosintetic şi încep să desfăşoare activitate autosintetică, replicîndu-şi ADN-ul. Deci, citoplasma ovulului induce sinteza ADN-ului în nucleii acestor celule deplin diferenţiate, care au cromozomi nereplicaţi. Dimpotrivă, aşa cum a constatat Graham, transplantarea nucleului aflat în ciclu autosintetic, în citoplasma unor celule deplin diferenţiate, duce la încetarea ciclului autosintetic şi trecerea la un ciclu heterosintetic, sintetizînd ARN.

Proteinele sintetizate în G_1, funcţionează numai ca iniţiatori ai sintezei ADN-ului, fiind diferite de proteinele sintetizate în procesul replicaţiei însăşi a cromozomului.

Principala caracteristică a ADN-ului este structura sa dublu-elicoidală regulată, fiind alcătuit din două lanţuri polimere răsucite unul în jurul celuilalt. Există patru nucleotide principale (nucleotidul este o asociere de bază azotată, dezoxiriboză şi radical fosforic) două purinice, adenina (A) şi guanina (G) şi două pirimidinice, timina (T) şi citozina (C). Lanţurile polimere sînt unite între ele prin punţi de hidrogen, totdeauna adenina unindu-se cu timina iar guanina cu citozina, acestea fiind singurele aranjamente posibile, căci

dacă s-ar uni două purine ar ocupa prea mult spaţiu iar două pirimidine ar ocupa un spaţiu prea redus, conferind neregularitate macromoleculei de ADN. Prin legarea unei purine de pirimidină şi viceversa, lanţurile dublei elice de ADN devin complementare. Atomii de hidrogen au localizări relativ stabile — fapt care este esenţial pentru funcţia biologică a ADN-ului (J. D. Watson, 1974). În lipsa acestei relative stabilităţi, adenina s-ar putea împerechea cu citozina iar guanina cu timina, ceea ce ar face ca frecvenţa mutaţiilor să fie foarte mare şi ar duce la o mare dezordine în transmiterea caracterelor ereditare, deoarece înlocuirea unei perechi de baze azotate cu o altă pereche reprezintă substratul molecular al mutaţiei genice. Potenţialul variabilităţii unei singure gene este de 4 n în care n reprezintă numărul de nucleotide din care este alcătuită fiecare genă. Dacă raportul A/T şi G/C este totdeauna unitar există mari variaţii ale raportului A+T/G+C la diferite specii, fiind mai apropiate la speciile înrudite.

Sinteza ADN-ului se realizează în trei etape succesive: sinteza pirimidin-nucleotidei, acidului uridilic şi a purinnucleotidei acidului inosinic, sinteza celor patru dezoxiribonucleotide trifosfat (d-ATP, d-TTP, d-GTP, şi d-CTP) sub controlul kinazelor specifice şi în sfîrşit, polimerizarea trifosfaţilor în prezenţa ADN-ului amorsă şi a enzimei ADN-polimerază (Fig. 43). Acest ADN amorsă este un ADN denaturat, monocatenar căci ADN-polimeraza este inactivă pentru un ADN dublucatenar, nativ, ea unind precursorii nucleotidici prin legături fosfodiesterice între grupările situate în poziţiile 3′ şi 5′.

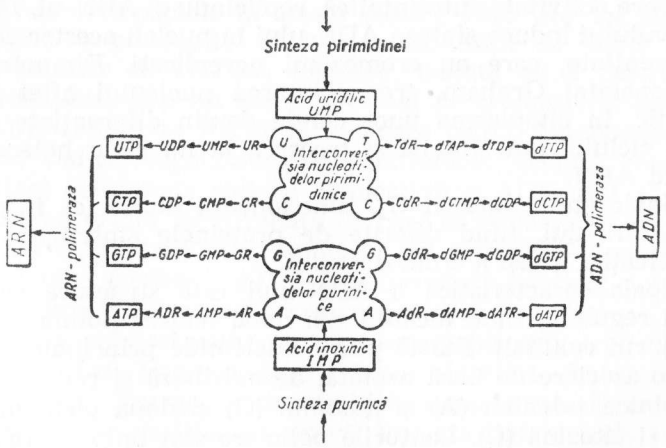


Fig. 43 — *Principalele faze ale sintezei acizilor nucleici* (după Kihlman, 1967).

Legăturile precise (punţile) de hidrogen între bazele complementare purinice şi pirimidinice, două între A=T şi trei între G≡C, fac posibilă duplicaţia exactă a unor secvenţe lungi şi complexe de nucleotide.

Replicarea macromoleculei de ADN este condiţionată de prezenţa nucleotidelor libere în stare fosforilată; procesul de încorporare al acestora în macromolecula de ADN nu presupune consum de energie, legăturile fosfatice fiind legături macroergice. În ţesuturile vegetale, iniţiatorul replicaţiei ADN-ului este timidinkinaza care catalizează fosforilarea timidinei. Enzimele implicate în sinteza şi fosforilarea nucleotidelor, ca şi acelea legate de procesul replicării sînt sintetizate printr-un control al activităţii genelor. ADN-ul reprezintă o matriţă informaţională pentru un sistem autoreplicator. Structura moleculară a ADN-ului este de aşa natură încît asigură ca replicatul să aibă acelaşi conţinut informaţional cu originalul.

Cele două lanţuri complementare ale macromoleculei de ADN, pot servi fiecare ca matriţă, pentru formarea unui lanţ complementar în raport cu el însuşi (Fig. 44). Legăturile de hidrogen dintre aceste două lanţuri complementare din matriţele parentale sînt deopotrivă puternic specifice şi relativ labile, încît nu este necesară intervenţia enzimatică nici pentru a le crea şi nici pentru a le rupe (J. D. Watson, 1974). De asemenea, rotaţia macromoleculei de ADN în jurul axei sale pentru a permite separarea prin dezră-

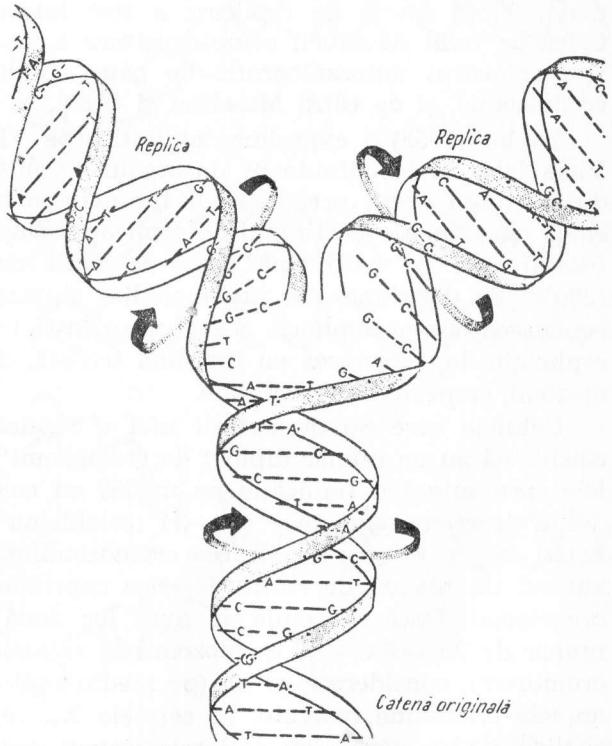


Fig. 44 — *Replicarea semiconservativă a ADN-ului după mecanismul propus de Watson şi Crick* (din G. S. Stent, 1971).

sucire a celor două catene complementare nu necesită o cantitate mare de energie. Dar în replicarea normală a unui ADN dublucatenar circular ruperea enzimatică a cel puțin unuia dintre lanțurile parentale prin acțiunea unei endonucleaze este obligatorie, aceste enzime rupînd legăturile fosfodiesterice.

Cele două catene se separă una de cealaltă făcînd posibilă intrarea nucleotidelor libere și atașarea lor de bazele complementare ale celor două catene existente, formîndu-se noi punți de hidrogen.

Prin procese enzimatice se formează noi legături covalente între grupările zahăr și fosfat ale nucleotidelor libere anterior. Se formează în felul acesta pentru fiecare catenă preexistentă o nouă catenă complementară (Fig. 45), dintr-un dublu helix de ADN, rezultînd, după acest model semiconservativ de replicare, două dublu-helixuri noi, în care cîte o catenă este veche, iar alta este nou-formată. Tipul acesta de replicare a fost intuit de către Watson și Crick pe baza structurii complementare a macromoleculei de ADN și demonstrat autoradiografic de către Taylor, în 1958, la nivel cromozomal, și de către Meselson și Stahl, la nivel molecular.

Taylor (1958) a experimentat inițial pe Vicia faba. Radicele de Vicia faba au fost ținute pe un mediu de cultură ce conținea timidină tritiată drept precursor al timinei, pentru o durată de timp egală aproximativ cu timpul de replicație. După aceea, radicelele au fost trecute pe colchicină (statmochinetic ce blochează formarea fusului de diviziune, dar nu împiedică sinteza ADN-ului, respectiv replicarea cromozomilor). S-au putut astfel număra ciclurile de replicație după tratarea cu timidină tritiată, după numărul de cromozomi, respectiv de cromatide.

Celulele care nu au suferit nici o replicație după trecerea în colchicină au un număr diploid de cromozomi $2n = 2x = 12$. Celulele care suferă o replicație pe mediu cu colchicină au un număr dublu de cromozomi $2n = 4x = 24$ (colchicina a acționat statmochinetic), nepermițînd repartizarea cromozomilor în doi nuclei fii, rezultînd un nucleu de restituție care cuprinde un număr dublu de cromozomi. Dacă în celule au avut loc două replicații, ele au un număr de $2n = 8x = 48$ cromozomi. În celulele ce au $2n = 2x = 12$ cromozomi, considerate în X_1 (pe mediu radioactiv), cromozomii au ambele cromatide marcate. În celulele X_2, ce au suferit o singură replicație ($2n = 4x = 24$), toți cromozomii sînt marcați, dar nu ambele cromatide ale fiecărui cromozom sînt marcate, ci numai cîte

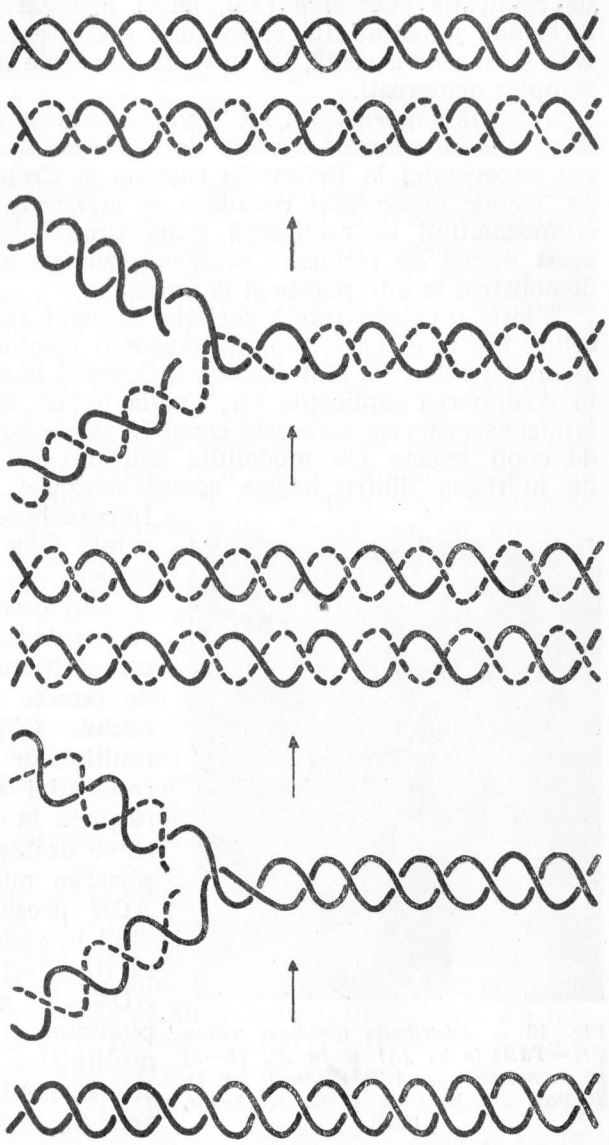


Fig. 45 — *Replicarea semiconservativă a ADN-ului.* Moleculele de ADN constau din două catene complementare care se spiralizează reciproc. Cînd se replică, ele se despiralizează și se separă, fiecare catenă sintetizîndu-și un nou partener. Aici sînt două cicluri de replicare: primul are loc pe mediu radioactiv și produce două catene marcate (helixuri punctate). Cînd molecula marcată se replică pe mediu neradioactiv, numai una din catenele macromoleculei de ADN va fi radioactivă (după Taylor, 1958).

una (numai în cazul în care a avut loc un schimb între cromatidele surori, ambele cromatide apar marcate, dar acest fapt este extrem de rar şi nesemnificativ). În celulele ce au suferit două cicluri de replicaţie succesive (X_3), adică celulele endo-octoploide ($2n = 8x = 48$), jumătate din cromozomi (24) prezentau o cromatidă marcată şi una nemarcată, iar cealaltă jumătate de cromozomi (24) erau complet nemarcaţi.

Această experienţă a lui Taylor conducea indubitabil spre postularea tipului semiconservativ de replicare a cromozomului. Repetarea experienţei la Bellevalia romana şi Crepis capilaris l-a condus pe Taylor la aceleaşi rezultate şi la aceeaşi concluzie: replicarea cromozomului se realizează după tipul semiconservativ. Ulterior, acest model de replicare semiconservativă a cromozomului a fost demonstrat la alte plante şi la animale.

Există o considerabilă variaţie în ciclul autosintetic al diferitelor celule ale unui organism. Cromozomii complementului cromozomal al unui nucleu nu sînt niciodată sincroni nici în începerea dar nici în terminarea replicaţiei lor. Dubla helice de ADN este o matriţă semiconservatoare care este capabilă să producă un număr nedefinit de copii exacte ale modelului său din cauza legăturilor precise de hidrogen dintre bazele complementare: A cu T şi G cu C. Împerecherea greşită a bazelor azotate duce la apariţia mutaţiilor genice.

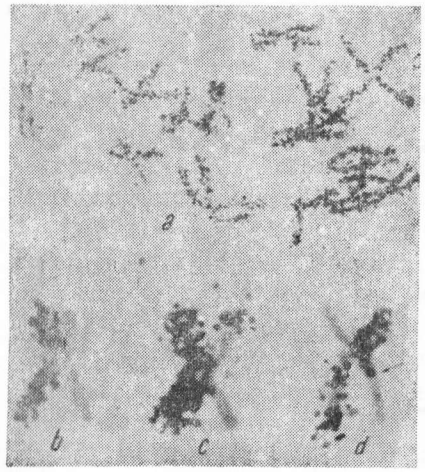


Fig. 46 — *Distribuţia timidinei tritiate (^3H-TdR) în X_1 (a) şi în X_2 (b—d) pe cromozomii de Allium* (după Dr. D. P. Fox, din B. John şi K. R. Lewis, 1969).

Din cercetările autoradiografice s-a dedus că sinteza ADN-ului este iniţiată la un număr diferit de puncte de-a lungul cromozomului (Fig. 46). Evidenţierea multiplelor puncte de iniţiere a replicaţiei cromozomului, dă un răspuns la întrebarea, cum poate să se desfăşoare atît de rapid replicarea multiplelor molecule de ADN prezente în cromozom, avînd în vedere şi lungimea imensă (la nivel molecular desigur) a ADN-ului prezent în cromozomii plantelor şi animalelor. Prezenţa multiplelor puncte de replicare a cromozomului este un răspuns la această problemă. La hamsterul chinezesc sinteza totală a ADN-ului se realizează în 6 ore. Lungimea macromoleculelor de ADN la un cromozom de lungime medie de la hamsterul chinezesc este de 9 cm. Considerînd viteza de replicare a cromozomului bacterian care este de 100 μm pe minut şi dacă ar funcţiona un singur punct de replicaţie atunci replicaţia ADN-ului cromozomului s-ar realiza în 15 ore.

La Lilium, cantitatea de ADN în complementul cromozomal haploid, reprezintă $53 \cdot 10^{-12}$ g de unde rezultă o lungime de $1{,}5 \cdot 10^7$ μm = 15 m.

După unele estimări numărul de spire ale unei asemenea duble helice de ADN este de $4{,}41 \cdot 10^9$. Pentru Lilium ($n = 12$ cromozomi) aceasta ar reprezenta $3{,}5 \cdot 10^8$ spire pentru un cromozom. Este greu de imaginat o despiralizare a unor atît de numeroase spire la fiecare replicare a ADN-ului. De aici, Taylor (1958) a propus un model de structură a cromozomului (Ribbon model) în care molecule mai scurte de ADN pornesc în unghi drept de la o structură axială centrală dublă (Fig. 38). Dubla spirală de ADN este astfel prinsă de această dublă structură axială, încît o catenă de ADN se leagă de o jumătate a structurii axiale, pe cînd cealaltă catenă complementară de ADN se leagă de cealaltă jumătate a dublei structuri axiale. La extremitatea liberă a catenei de ADN s-ar putea iniţia replicarea după schema Watson-Crick. Şi modelul lui Freese implică, din aceleaşi considerente care l-au determinat pe Taylor să elaboreze modelul „Ribbon", o spirală dublă de ADN, lungă şi întreruptă. În cadrul modelului Freese (Fig. 35) moleculele de ADN alternează cu unităţi de legătură. În acest caz numai un lanţ (o catenă) a elicei de ADN este fixat de un element de legătură, pe cînd celălalt se învîrteşte liber în faţa elementului următor. Pe acest element este apoi fixat celălalt lanţ al spiralei duble de ADN. Ambele sisteme de lanţuri de ADN şi elementele de legătură, au polaritatea opusă. Modelul descris pînă aici este conform cu starea despiralizată, interfazică a cromozomului; în stadiile de condensare ale cromozomului, elementele de legătură formează o structură ordonată.

Asincronia în replicare există şi între cromozomii complementului cromozomal nu numai la nivelul unui cromozom unde regiunile eucromatice alternează cu cele heterocromatice.

Replicarea cromozomilor din garnitura de cromozomi a unei specii se realizează asincron, fapt constatat la început de către Lima-de-Faria la Secale cereale şi Melanopus differentialis. La mamifere, indiferent de numărul de cromozomi X prezenţi în complementul cromozomal, doar unul (acela care este funcţional) îşi replică ADN-ul în acelaşi timp cu replicarea ADN-ului din autozomi. Ceilalţi cromozomi X se replică mai tîrziu. Aceşti cromozomi X cu re-

plicare tardivă sînt heterocromatinizaţi şi ei dau corpusculi Barr sau cromatinele sexuale, al căror număr este n = X — 1, ceea ce înseamnă că doar unul din cromozomii X este funcţional şi nu se heterocromatinizează.

La eucariote, sinteza ADN-ului la nivelul diferitelor segmente cromozomale se realizează asincron, de unde s-a emis ipoteza că la eucariote cromozomul este format prin asocierea de material genetic cu origine diferită. Cromozomul eucariotelor ar fi alcătuit dintr-o succesiune de cromozomi bacterieni de mărimi diferite. Cu alte cuvinte cromozomul eucariotelor ar fi format din mai mulţi repliconi de tipul cromozomului bacterian, care prezintă asincronie în replicare, şi aceşti repliconi ar putea fi consideraţi moleculele de ADN, ce pornesc ca nişte proiecţii laterale din axul proteic dublu, în cadrul modelului „Ribbon" al lui Taylor. După viteza de replicare şi durata totală a stadiului S, în celula umană s-a calculat că există 3 000 de repliconi repartizaţi pe cei 46 de cromozomi. Replicarea asincronă a ADN-ului unei celule, la nivelul cromozomilor diferiţi ai garniturii sale şi în acelaşi timp la nivelul diferitelor regiuni ale aceluiaşi cromozom, dar într-o secvenţă bine definită, şi specifică tipului celular considerat indică existenţa unui control genetic al secvenţei replicaţiei. S-a arătat că, în general, heterocromatina se replică după replicarea eucromatinei, iar replicarea la extremităţile cromozomului precede pe aceea a regiunii centrale.

Cromozomii X, heterocromatici, de la femelele mamiferelor, prezintă o replicare tardivă, la cîteva ore după iniţierea sintezei ADN în regiunile eucromatice.

La Planococcus citri, s-a evidenţiat, în unii nuclei poliploizi un caz unic de control al sintezei ADN-ului, în care întregul set de cromozomi heterocromatici rămîne nereplicat, pe cînd cromozomii eucromatici suferă repetate cicluri de replicaţie. Sînt şi unele excepţii în care replicarea are loc ceva mai devreme, la nivelul zonelor heterocromatice, aşa cum a stabilit Tanaka, în 1965, la Spiranthes sinensis. La Scilla campanulata, Evans şi Rees au constatat că replicarea ADN-ului se termină mai devreme în apropierea centromerilor şi la capetele cromozomilor, şi mai tîrziu la nivelul segmentelor intermediare.

S-a constatat că regiunile cromozomale, în care cantitatea de ADN cu replicare tardivă pe unitatea de lungime a cromozomului este cea mai mare, au cea mai mare frecvenţă a chiasmelor în profaza meiotică.

Replicarea ADN-ului reprezintă principalul fenomen chimic al ciclului mitotic şi apare în timpul stadiului metabolic interfazic. Ea se desfăşoară în funcţie de constituţia genetică a speciei considerate şi de mediul intracelular, care la rîndul său este determinat în măsură importantă de stadiul de dezvoltare a ţesutului considerat.

După cum am văzut, însăşi replicarea ADN-ului nu se desfăşoară simultan în toate părţile cromozomului. În general, regiunile heterocromatice se colorează diferenţiat faţă de cele eucromatice ale cromozomului şi îşi replică ADN-ul la perioade de timp diferite faţă de acestea din urmă. Concomitent cu sinteza ADN-ului sînt sintetizate şi unele proteine cromozomale; altele sînt sintetizate la momente diferite ale ciclului mitotic.

Replicarea cromozomului eucariotic este un proces mult mai complex decît replicarea ADN-ului sau a cromozomului procariotelor presupunînd reproducerea cromozomului (replicarea ADN-ului cromozomal şi a proteinelor cromozomale) şi individualizarea celor două catene vizibil separate, adică a cromatidelor. Dacă reproducerea are loc în stadiul metabolic (interfază) iar individualizarea cromozomilor în profaza timpurie sau mijlocie, separarea începe în profaza tîrzie şi continuă pînă în metafază. Centromerii se separă în prometafază şi apar complet distincţi unul de celălalt în metafază. La început, în profaza tîrzie, se separă regiunile distale şi mediane ale braţelor cromozomale. În metafaza tîrzie şi anafaza timpurie se separă regiunile proximale, adiacente centromerului. După cum s-a arătat, multe date sînt conforme cu existenţa pentru fiecare cromozom a 2 pînă la 4 cromoneme.

Mecanismul separării cromozomilor fii implică formarea fusului de diviziune, orientarea regulată a cromozomilor la ecuator şi separarea cromozomilor fii în anafază printr-un joc antagonist al fibrelor fusoriale şi fibrelor cromozomale ale fusului de diviziune.

Deoarece molecula de ADN din cromozomul organismelor superioare este foarte lungă, iniţierea replicaţiei, dependentă de proteine iniţiatoare, trebuie să se facă în mai multe puncte. Cromozomii organismelor superioare conţin o serie de puncte iniţiatoare, constînd din mai multe serii de subunităţi autoreplicatoare (repliconi), care se replică independent unul de altul şi uneori între ei replicarea este în tandem, fiind menţinuţi împreună prin legături rezistente la pronază.

La bacterii, evidenţierea tipului semiconservator de replicare a ADN-ului a fost demonstrat de M. Meselsohn şi F. W. Stahl la Escherichia coli, punînd la punct o tehnică de ultracentrifugare în gradient de densitate, care a permis separarea ADN-ului de densităţi diferite: ADN-ul ce conţinea N^{15} de ADN ce conţinea N^{14}. Amestecul acestor două fracţiuni de ADN, într-o soluţie de clorură de

cesiu, cu densitatea medie egală cu 1,72, a fost centrifugat 24 h, la 100.000 g. S-au putut separa astfel cele două tipuri de ADN, cu N^{14} și cu N^{15}. S-au cultivat bacterii pe un mediu de cultură cu N^{15} care a fost încorporat în ADN-ul acestor bacterii. După aceea, bacteriile au fost cultivate pe mediu cu azot obișnuit N^{14}. S-a urmărit numărul de diviziuni ale bacteriilor pe mediu cu N^{14} și repartiția densității ADN-ului extras de la bacterii. La un anumit timp, ce a corespuns unei generații bacteriene, s-a evidențiat un ADN cu densitatea intermediară între ADN cu N^{15} și ADN cu N^{14}. În generațiile bacteriene următoare se reducea proporția de ADN hibrid, crescînd proporția de ADN cu N^{14} (nemarcat) după cum reiese din tabelul Nr. 2.

TABELUL Nr. 2

Proporția dintre ADN marcat, hibrid, și nemarcat, de-a lungul generațiilor

Generația	ADN greu marcat cu N^{15}	ADN hibrid ($N^{15} \times N^{14}$)	ADN ușor (nemarcat) (N^{14})
0	100%	0	0
1	0	100%	0
2	0	50%	50%
3	0	25%	75%
4	0	12%	88%

ADN-ul hibrid, intermediar după densitate, este compus din două subunități, una grea și alta ușoară. Replicarea sa este semiconservativă: o subunitate este conservativă (N^{15}) și subunitatea nou formată este complementară ei avînd (N^{14}). Molecula de ADN astfel obținută, după o replicare, este o moleculă hibridă.

Prin denaturare, la 85°, s-a reușit desfacerea celor două catene complementare de ADN hibrid ($N^{15} \times N^{14}$). După răcire bruscă s-a reușit să se obțină o soluție ce conținea catene grele și catene ușoare de ADN care au putut fi separate prin tehnica de centrifugare în gradient de densitate. În felul acesta, Meselsohn și Stahl au reușit să demonstreze experimental modelul semiconservativ de replicare a ADN-ului propus de Watson și Crick, la nivel molecular, după ce Taylor reușise să demonstreze replicarea semiconservativă la nivel cromozomal.

Modelul semiconservativ de replicare a cromozomului bacterian a fost evidențiat de către J. Cairns, în 1963. Cromozomul bacterian, circular (Fig. 47), a fost marcat cu izotopi radioactivi prin cultivarea bacteriilor pe un mediu ce conținea marcat precursorul timinei — timidina tritiată. Extragerea cromozomului bacterian s-a realizat

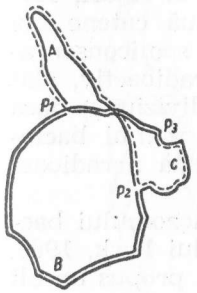


Fig. 47 — Autoradiografia cromozomului bacterian intact de Escherichia coli, care a încorporat timidină tritiată în ADN-ul său, din care se desprinde modelul semiconservativ de replicare (după G. S. Stent, 1971)

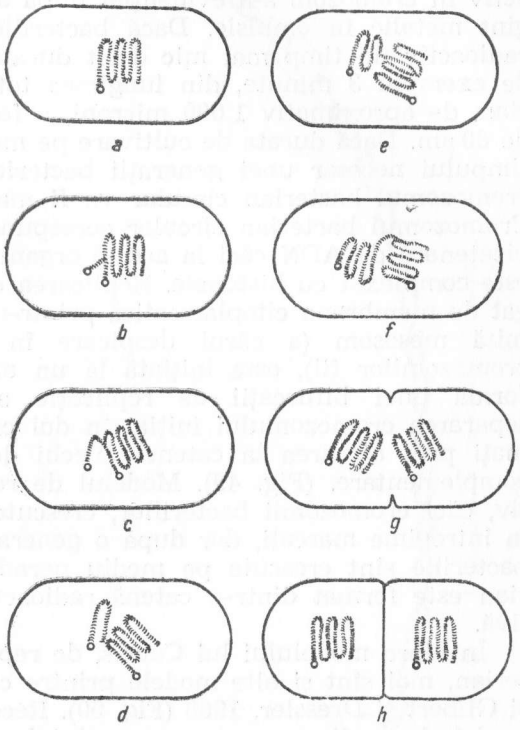


Fig. 48 — *Reconstituirea ipotetică a replicației cromozomului la bacterii : a* — cromozom înainte de replicare cu un corp membranos (cerc alb) la extremitatea sa, a cărui fixare pe membrana citoplasmatică nu este reprezentată ; *b* — începutul replicației cromozomului care ia configurație de Y, punctul negru marchează centrul de dublare a cromozomului (ADN-ului) fiind un punct de creștere ; după dublare pe plan molecular a dublei elice de ADN, ADN-ul trece din nou în structura sa terțiară ; *c* și *d* — începutul rotației cromozomului și creșterea distanței dintre corpurile membranoase (cercurile albe) ; *e, f* — alunecarea laterală, în afară, a cromozomilor fii ; *g, h* — terminarea diviziunii cromozomului bacterian și diviziunea celulară. (din P. Giesbrecht și G. Drews, 1971).

printr-o tehnică fină, care a permis menţinerea integrităţii acestuia. S-a folosit o emulsie fotografică întinsă pe o placă pe care s-au etalat cromozomii bacterieni care, avînd încorporată timidina tritiată, au impresionat emulsia fotografică. Prezenţa izotopului radioactiv în cromozom s-a evidenţiat după apariţia graine-urilor de argint metalic în emulsie. Dacă bacteriile au fost ţinute pe mediu radioactiv un timp mai mic decît durata unei generaţii bacteriene, de exemplu 3 minute, din lungimea totală a cromozomului bacterian, de aproximativ 1 000 microni, a fost marcată doar o porţiune de 60 μm. Dacă durata de cultivare pe mediul radioactiv a fost egală timpului necesar unei generaţii bacteriene (unei diviziuni), atunci cromozomul bacterian circular va fi marcat pe toată lungimea sa. Cromozomul bacterian circular corespunde unei molecule circulare, bicatenare de ADN căci la aceste organisme procariote, ADN-ul nu este complexat cu histonele. Replicarea cromozomului bacterian, legat de membrana citoplasmatică printr-o formaţiune a acesteia numită mesosom (a cărui despicare în două ajută la separarea cromozomilor fii), este iniţiată la un anumit punct (Fig. 48), sub forma unei bifurcaţii de replicaţie a cărei înaintare duce la separarea cromozomului iniţial în doi cromozomi fii circulari, formaţi prin ataşarea la catenele vechi de ADN a două catene noi complementare. (Fig. 49). Modelul de replicaţie este semiconservativ, căci cromozomii bacteriilor, crescute pe mediu radioactiv, sînt în întregime marcaţi, dar după o generaţie (după o diviziune) dacă bacteriile sînt crescute pe mediu neradioactiv, cromozomul bacterian este format dintr-o catenă radioactivă şi o catenă neradioactivă.

În afara modelului lui Cairns, de replicare a cromozomului bacterian, mai sînt şi alte modele printre care cele ale lui Lark, 1966, şi Gilbert şi Dressler, 1968 (Fig. 50). Recent, Gilbert a propus un alt model de replicare a cromozomului bacterian, bazat pe faptul că prezenţa numeroaselor fragmente scurte de ADN în timpul replicaţiei cromozomului la Escherichia coli ar infirma modelul propus de Cairns. Gilbert admite că în cursul replicaţiei cromozomului bacterian are loc o scindare a unei catene a macromoleculei de ADN într-un anumit punct, creînd posibilitatea ca una din extremităţile C'_5 ale sale să se ataşeze de membrana citoplasmatică. O catenă circulară de ADN este intactă, iar alta este fragmentată. Modelul este tot semiconservativ pentru catena intactă pe care se sintetizează o nouă catenă complementară. Catena fragmentată este reansamblată într-un cromozom bacterian circular după o prealabilă dedublare semiconservativă a fragmentelor sale urmată de ansamblarea lor într-o structură circulară.

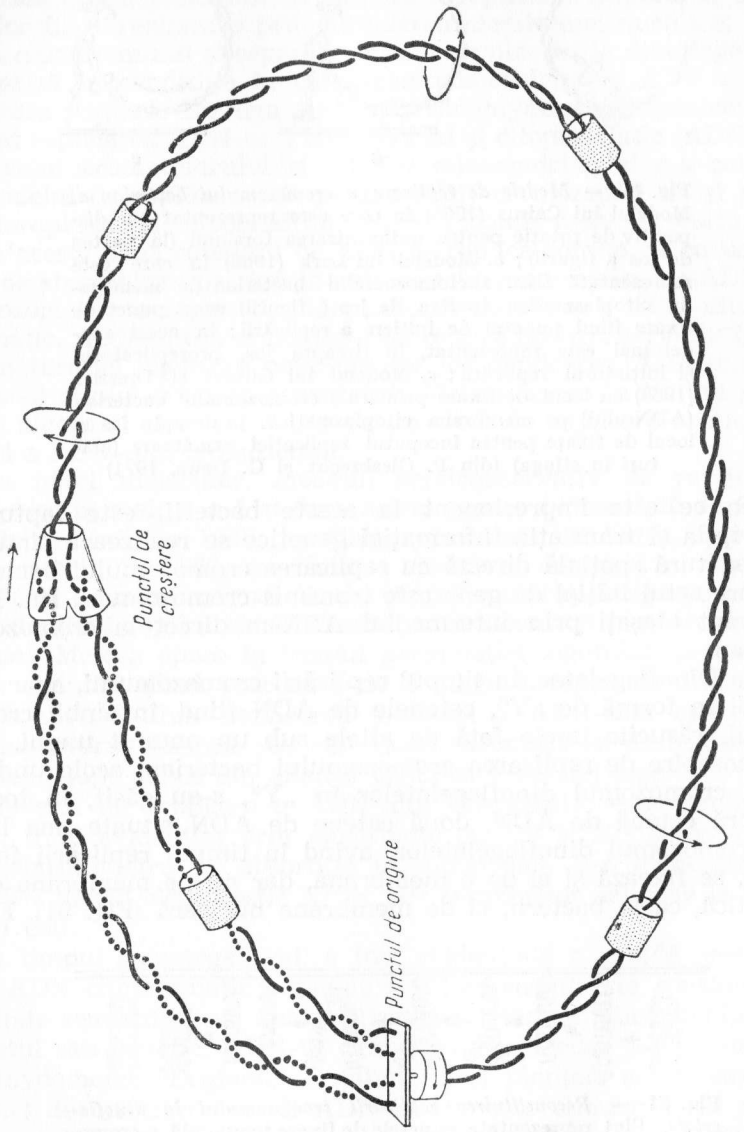


Fig 49 — *Replicarea cromozomului bacterian.*

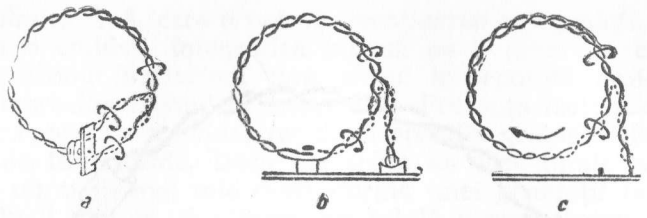


Fig. 50 — *Modele de replicare a cromozomului bacterian a.* Modelul lui Cairns (1963) în care este reprezentat un dispozitiv de rotație pentru uniformizarea torsiunii (la partea de jos a figurii); *b.* Modelul lui Lark (1966) în care este reprezentată fixarea cromozomului bacterian de membrana citoplasmatică (partea de jos a figurii) acest punct de fixare fiind punctul de inițiere a replicării; în acest model mai este reprezentat, în dreapta jos, proreplicatorul și inițiatorul replicării; *c.* Modelul lui Gilbert și Dressler (1968) cu locul de fixare primară a cromozomului bacterian (ADN-ului) pe membrana citoplasmatică, la dreapta jos și locul de fixare pentru începutul replicației următoare (alături în stînga) (din P. Giesbrecht și G. Dews, 1971)

Ceea ce este impresionant la aceste bacterii, este faptul că transcripția și translația informației genetice se realizează simultan și în legătură spațială directă cu replicarea cromozomului bacterian prin care setul inițial de gene este transmis cromozomului fiu. Polizomii sînt atașați prin intermediul ARN-m direct la cromozomul bacterian.

Și la Dinoflagelatae, în timpul replicării cromozomului, apar configurații în formă de „Y", catenele de ADN fiind, în ambii cromozomi fii, răsucite unele față de altele sub un anumit unghi. Dar, spre deosebire de replicarea cromozomului bacterian, acolo unde se bifurcă cromozomul dinoflagelatelor în „Y", s-au găsit, în loc de o singură catenă de ADN, două catene de ADN situate una lîngă alta. Cromozomul dinoflagelatelor, avînd în timpul replicării formă de „Y", se fixează și el de o membrană, dar nu pe membrana citoplasmatică, ca la bacterii, ci de membrana nucleară (Fig. 51). Fixarea cromozomului dinoflagelatelor de membrana nucleară se face la partea opusă punctului de inițiere a replicării. Separarea cromozomilor fii se realizează prin întinderea membranei nucleare. Replicarea cromozomului și separarea cromozomilor fii la dinoflagelate se realizează în condițiile în care macromoleculele de ADN prezintă structura terțiară. La alga eucariotă Chlamydomonas reinhardi, s-a studiat replicarea ADN-ului cromozomal și citoplasmatic (ADN-ul de la nivelul cromatoforului și ADN-γ mitocondrial) și s-a constatat că modelul de replicare atît pentru ADN cromozomal cît și pentru cel cloroplastic și mitocondrial este semiconservativ. În culturi sincrone aceste două categorii de ADN se replică coordonat cu un înalt grad de sincronism, pe cînd în culturi asincrone replicarea ADN-ului cromozomal este separată, independentă de aceea a ADN-ului citoplasmatic. ADN-ul din cromatofor se replică semiconservativ în timpul maturației zigotului cînd nu are loc replicarea ADN-ului cromozomal și nici diviziunea nucleară. Meioza apare în timpul germinației zigotului și este însoțită de un ciclu de replicare semiconservativă a ADN-ului cromozomal.

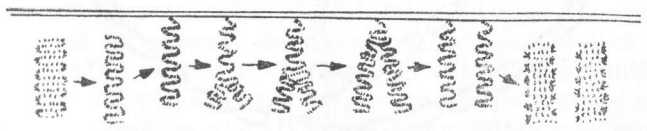


Fig. 51 — *Reconstituirea replicării cromozomului la dinoflagelate.* Sînt reprezentate punctele de fixare temporală a cromozomului pe membrana nucleară precum și procesele de condensare și expansiune (după P. Giesbrecht și G. Dews, 1971)

La nivel molecular, modelul semiconservativ de replicare a ADN-ului în meioză a fost demonstrat pentru prima dată de Chiang și colaboratorii, în 1965. La Chlamydomonas reinhardi, Sueoka și colaboratorii, în 1967, au făcut o descriere detaliată a replicației ADN-ului cromozomal meiotic. În timpul maturației zigosporului, nu se evidențiază replicarea ADN-ului cromozomal și nici desfășurarea meiozei. Meioza apare în timpul germinației zigotului, prima diviziune meiotică fiind precedată de o singură replicare semiconservativă a ADN-ului. Replicarea meiotică a ADN-ului apare după crossing-overul sinaptic sau cele două fenomene se desfășoară concomitent, fapt dedus din analiza genetică a acestei alge.

Modelul de replicare a ADN-ului cloroplastic este semiconservativ, fiind evidențiat prin experiențe cu N^{14} și N^{15} și dozarea cu microdensitometru cu absorbție în ultraviolet. S-a evidențiat clar un ADN hibrid cloroplastic $N^{14} \times N^{15}$ asemănător celui de la Escherichia coli.

În timpul gametogenezei, a fost evidențiată o rapidă creștere a unui ADN citoplasmatic notat cu γ. Cloroplastul este considerat ca o unitate semiautonomă autoduplicatoare citoplasmatică, echipată cu aparatul său genetic. ADN-ul cloroplastic, așa cum s-a constatat la Chlamydomonas, Euglena, Acetabularia și plantele superioare, este distinct de cel cromozomal. ADN-ul său este circular și se replică după modelul semiconservativ evidențiindu-se un hibrid de ADN „$N^{15} \times N^{14}$".

Replicarea ADN-ului cloroplastic şi cromozomal este decalată în timp în ciclul vegetativ şi sexuat, ceea ce denotă faptul că cloroplastul are un genom şi un mecanism de autoreplicaţie proprie.

La Euglena gracilis, s-au remarcat schimbări în morfologia mitocondriilor în timpul ciclului celular şi replicarea ciclică a ADN-ului cromozomal şi mitocondrial, la acesta din urmă realizîndu-se numai la începutul şi în timpul primei faze a diviziunii celulare.

Eucariotele şi procariotele prezintă mai multe asemănări decît deosebiri în mecanica activităţii cromozomale la nivel molecular. Marile deosebiri apar însă la nivelul supramolecular, al organizării cromozomale şi celulare.

În timpul profazei meiotice la multe organisme s-a evidenţiat desfăşurarea unei sinteze replicative de ADN ce reprezintă doar 0,3% din ADN-ul replicat în interfaza premeiotică. Se consideră că această fracţiune de ADN intervine în procesele reparatorii ce se desfăşoară în urma ruperii reunirii cromozomilor meiotici care realizează recombinarea genetică.

Capitolul V

PARTICULARITĂŢILE MULTIPLICĂRII FORMELOR PRECELULARE (ACELULARE) DE VIAŢĂ

Apariţia vieţii pe pămînt a fost rezultatul unei îndelungate evoluţii a materiei anorganice. Ea a reprezentat, după părerea lui Engels, o necesitate de granit a evoluţiei materiei iar dispariţia ei va implica aceeaşi necesitate. Ca atare, viaţa a apărut nu ca un fenomen izolat, întîmplător, ci ca o necesitate a evoluţiei materiei în general. Apariţia vieţii — un fenomen cosmic în esenţă — s-a produs acolo unde condiţiile planetare au fost prielnice şi odată realizată a anulat prin ea însăşi aceste condiţii ale apariţiei vieţii. Iată de ce viaţa, acest fenomen extrem de complex, odată apărută, este supusă unei evoluţii permanente, iar reapariţia vieţii în formele sale primordiale, a devenit imposibilă. Spirala dialectică a dezvoltării nu cunoaşte reveniri la stadiile iniţiale ale procesului. Evoluţia este ireversibilă.

Desigur, mintea iscoditoare a omului a căutat să afle care a fost molecula iniţială, înzestrată cu atributele miracolului vieţii — o proteină, o nucleoproteină, o genă nudă, sau un virus, şi din care, printr-o spectaculoasă evoluţie, prin procese de reproducere, mutageneză şi multiplicare să rezulte sistemele biologice atît de complexe, cunoscute astăzi. Teoria Oparin-Haldane aruncă o lumină în această problemă. Din „supa organică" iniţială s-au izolat coacervatele — substanţe polimoleculare. Cînd acestea au fost capabile să folosească energia din mediu, ele au manifestat unele particularităţi primare ale sistemelor biologice, bunăoară aspecte de metabolism, prin care au reuşit să-şi mărească dimensiunile prin înglobarea altor corpusculi mai mici — creştere. Pe de altă parte cele mari s-au divizat în altele mai mici — realizînd „reproducerea". Cînd unele din aceste coacervate au devenit mai eficiente în folosirea resurselor de mediu, mai rezistente la acţiunea radiaţiilor etc., au constituit obiect de acţiune cu predilecţie al selecţiei naturale şi au devenit nişte sisteme mai stabile, capabile de autoreproducere.

Autoreproducerea este una din caracteristicile esenţiale ale materialului genetic, dar ea se interconectează cu funcţia heterocatalitică prin care sînt controlate sintezele celulare specifice. Într-un „sistem biologic minimal", funcţia autocatalitică (autoreproducerea, replicaţia) şi cea heterocatalitică (transcripţia informaţiei ereditare, urmată de translaţie în procesul sintezei proteice) sînt procese vitale, esenţiale. Într-un asemenea sistem biologic minimal se pot desfăşura procese metabolice — în fond reacţii enzimatice — care stau la baza unităţii de acţiune a sistemului. Este în fond interacţiunea complexă acizi nucleici — proteină, un complex de interdependenţe care constituie esenţa fenomenului biologic.

Etapa esenţială în constituirea sistemului biologic primar a fost reprezentată de stabilirea interacţiunii dintre substanţele proteice şi acizii nucleici, moment în care a fost generat un sistem de control extrem de eficient pentru programul sistemului biologic. În cadrul acestui sistem biologic iniţial a avut loc o specializare funcţională a macromoleculelor organice: acizii nucleici au preluat funcţia de deţinători (codificatori) ai informaţiei ereditare, fiind matriţe pentru propria lor reproducere (funcţie pe care au dobîndit-o graţie stabilităţii chimice mai mari a macromoleculei lor), pe cînd substanţele proteice au început să îndeplinească rol structural şi enzimatic. Pentru existenţa sistemului biologic interacţiunea nucleoproteică este esenţială. Stabilirea unei colinearităţi precise între secvenţa bazelor azotate din macromolecula acizilor nucleici şi aceea a aminoacizilor din macromolecula proteică, a dus la delimitarea unui sistem informaţional din cadrul primelor organisme vii, adică codul lor genetic, cod care a evoluat şi el, în special prin eliminarea codonilor nonsens, după părerea codescoperitorului structurii macromoleculei de ADN, F. Crick.

Odată apărute, primele vieţuitoare au constituit obiectul de acţiune al selecţiei naturale, care a dus la perfecţionarea lor permanentă, la evoluţia acestora. Mişcarea biologică a pornit de la forme primitive de organizare, ajungînd la forme evoluate culminînd cu omul, la care evoluţia istoric-naturală s-a continuat cu evoluţia istoric-socială.

Surprinzătoare este însă existenţa unor forme acelulare sau precelulare de viaţă (mai sînt încă discuţii asupra problemei dacă virusurile sînt sau nu organisme vii) alături de cele mai perfecţionate sisteme biologice.

Ce sînt virusurile şi care sînt particularităţile lor de multiplicare? La aceste întrebări s-a răspuns în ultimul timp graţie introducerii în cercetarea curentă a metodelor perfecţionate de autoradiografie şi microscopie electronică. Virusurile reprezintă o categorie

aparte de agenţii infecţioşi, alcătuiţi dintr-un singur tip de acid nucleic, — ADN — în cazul adenovirusurilor şi ARN — la ribovirusuri, şi dintr-o teacă proteică (Fig. 52). ADN-ul virusurilor poate fi liniar sau circular. Cel liniar este dublu catenar pe cînd cel circular poate fi atît monocatenar cît şi dublu catenar, la fagul Φ X174 este un ADN monocatenar care prezintă şi o formă replicativă (RF) care este dublu catenară, una din catenele sale ataşîndu-se de membrana citoplasmatică a celulei gazdă, cealaltă rotindu-se pe măsură ce este replicată. Virusurile au informaţie genetică ce controlează propria lor reproducere. Structura lor este complexă şi organizată, prezentînd capacitate de reduplicare, fapt care se apropie de sistemele biologice propriu-zise. Totuşi, virusurile se deosebesc de acestea, deoarece prezintă un singur fel de acid nucleic (fie ADN, fie ARN). Informaţia genetică a lor este redusă doar la controlul replicaţiei genoforului viral şi la reglajul sintezei proteinei virale. Fiind lipsite de un echipament enzimatic, virusurile nu pot prezenta trăsătura esenţială a sistemelor biologice propriu-zise — adică metabolismul — deosebindu-se esenţial de acestea. Dacă în cazul organismelor biologice tipice, reproducerea apare ca un proces integrat al replicării materialului genetic şi al constituenţilor celulari, la virusuri reproducerea este realizată numai pe baza genoforului (materialul genetic viral) fiind dependentă de metabolismul celulei gazdă, în afara căreia particula virală fiind absolut inertă şi neputîndu-se reproduce. Virusurile nu cresc printr-o mărire treptată a dimensiunilor lor, din care cauză nici nu se multiplică printr-un mijloc de diviziune obişnuit, cum ar fi cel mitotic de pildă. Virusurile sînt paraziţi de nivel genetic (J. D. Watson. 1974). Celula gazdă pune la dispoziţia genoforului viral toate componentele necesare reproducerii noilor particule virale. În fond cel mai specific caracter al virusurilor este probabil acela că sînt paraziţii intracelulari obligatorii ai unor gazde specifice, relaţiile dintre virus şi celula gazdă fiind mai intime decît oricare alte relaţii parazit-gazdă: fiind inerte metabolic, datorită lipsei echipamentului enzimatic, virusurile sînt

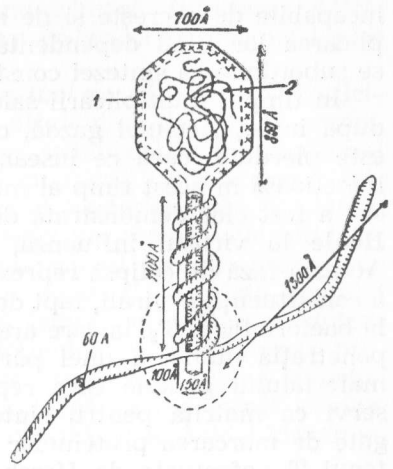


Fig. 52 — *Modelul de structură al bacteriofagului.* 1. teaca proteică (capsida); 2. miezul de acid nucleic.

incapabile de a creşte şi de a se multiplica de-sine-stătător, multiplicarea lor fiind dependentă de metabolismul celulei gazdă, care se subordonează sintezei constituenţilor virali.

În timpul multiplicării sale intracelulare ce are loc la scurt timp după infecţia celulei gazdă, cea mai mare parte a activităţii virale este pierdută, ceea ce înseamnă că virusul nu există ca particulă infecţioasă în acest timp al multiplicării. Această „perioadă de eclipsă" a fost clar demonstrată de Doermann la bacteriofagi şi de către Henle la virusul influenza, după infecţia membranei allantoide. Această fază de eclipsă reprezintă rezultatul diferenţierii funcţionale a constituenţilor virali, fapt demonstrat de Hershey şi Chase, în 1952, la bacteriofagul T_2, la care are loc, după absorbţia sa pe celula gazdă, penetraţia numai a unei părţi din componentele sale şi anume a materialului genetic care reprezintă un cromozom liber ce poate servi ca matriţă pentru sinteza de noi virusuri. Experienţele legate de marcarea proteinelor cu S^{35} şi a ADN-ului cu P^{32}, la colifagul T_2, efectuate de Hershey şi Chase au dovedit acest adevăr. Particula fagică este absorbită pe bacterie. Constituenţii interni, în esenţă ADN-ul, sînt „injectaţi" în celula gazdă, pe cînd „fantoma" reprezentată de proteina fagică rămîne în afară. Recent s-a constatat că în bacteria gazdă împreună cu ADN fagic sînt injectate şi unele poliamine care pot neutraliza 1/3 — 1/2 din grupările fosfat ale ADN-ului fagic, neasociat cu proteinele bazice. Fagul T_4 conţine putrescina, spermidina şi ioni de Mg iar fagul de Salmonella, PTL-22, conţine spermină.

La adenovirusuri (dezoxiribovirusuri) de tip T sau λ, macromolecula de ADN formează un cromozom liniar de 17 μm lungime la fagul λ şi 52 μm lungime la T_2 şi T_4. Cînd pătrunde în bacterie, cromozomul viral liniar devine circular.

O descoperire de dată şi mai recentă (1972) aparţinînd cercetătorilor P. Bourgaux şi D. Bourgaux — Ramoisky, de la departamentul de microbiologie al Universităţii din Sherbooke, Quebec, a dus la izolarea unui complex nucleoproteinic din virusurile Polyo şi SV 40. După aceşti autori, proteinele asociate cu ADN-ul viral sînt responsabile pentru supraspiralizarea acestui ADN. La bacteriofagii T, cromozomul este reprezentat de un ADN fibrilar nespiralizat (Du Praw, 1970). Fixarea particulei fagice pe celula gazdă se realizează prin coada sa, capătul acesteia fiind disociat într-o serie de filamente care aderă la membrana celulară bacteriană. Fixarea este sau nu reversibilă şi necesită ioni metalici. Ataşarea ireversibilă a fagului de bacterie este un proces extrem de specific comparabil cu o reacţie de tip antigen-anticorp şi este sub control genetic. Injectarea ADN-ului viral este dependentă de temperatură şi de prezenţa

compuşilor ce prezintă o grupare amino-primară. Injectarea ADN-ului este un proces foarte complex bazat pe acţiunea enzimei fagice asupra peretelui celulei bacteriene.

În ADN-ul fagului T_2, în locul citozinei se află hidroximetilcitozina, făcînd ca el să poată fi clar diferenţiat de cel al gazdei. În acest fel au putut fi evidenţiate mari schimbări în metabolismul celular în momentul infecţiei bacteriei cu fagul T_2. S-a arătat astfel că în acest moment sinteza ADN-ului bacterian este blocată şi începe sinteza rapidă a ADN-ului fagic pe seama nucleotidelor bacteriene. Ulterior este sintetizat şi materialul proteic. Experienţe de tratare cu cloramfenicol, prin care poate fi disociată complet sinteza ADN-ului de aceea a proteinei fagice, au arătat că sinteza ADN-ului continuă în prezenţa antibioticului pe cînd sinteza proteică este blocată reversibil. S-a demonstrat că în urma infecţiei fagice est sintetizabilă o „proteină timpurie" ce reprezintă enzime care determină conversia acidului dezoxicitidilic în acid hidroximetildezoxicitidilic (HMC).

Multiplicarea fagului se pare că se află şi sub influenţa unui ARN de înaltă activitate metabolică ce are un raport în baze diferit de acela al ARN-ului bacterian total şi care este apropiat de cel al ADN-ului fagic, deoarece s-a demonstrat că RN-aza şi 2-thiouracilul pot bloca multiplicarea fagului. După ce proteinele fagice sînt sintetizate sub controlul genetic al ADN-ului fagic, ele constituie teaca proteică a noilor particule fagice. În sinteza proteinelor fagice intervine desigur ARN-ul. Tot sub control fagic se produce o enzimă numită de Jacob şi Fuerst „endolizină", care lizează peretele celulei bacteriene, putîndu-se elibera noile particule fagice. Iată deci că, în mod obişnuit, virusurile, multiplicîndu-se în celula gazdă, determină distrugerea acesteia. ADN-ul bacteriofagului pătruns în celula bacteriană îşi desfăşoară cele două funcţii esenţiale ale sale: replicativă, folosind nucleotidele din celula gazdă şi heterocatalitică, dirijarea sintezei proteinelor virale pe seama aminoacizilor liberi din celula gazdă. Este deci vorba de un caz tipic de parazitism absolut.

Virusurile au un ciclu de viaţă particular care începe cu starea adultă sau de repaus, continuînd cu absorbţia şi fixarea pe celula gazdă, infecţia virală (injectarea ADN-ului viral în bacterie, în cazul bacteriofagilor), replicarea genomului viral în celula gazdă, sinteza de proteine virale şi resinteza de virusuri din ADN-ul viral şi proteinele virale. Are loc eliberarea bacteriofagilor nou-formaţi din celula bacteriană prin liza acesteia, încheindu-se astfel ciclul litic al bacteriofagului (Fig. 53).

Celula gazdă bacteriană pune la dispoziţia replicării şi sintezei,

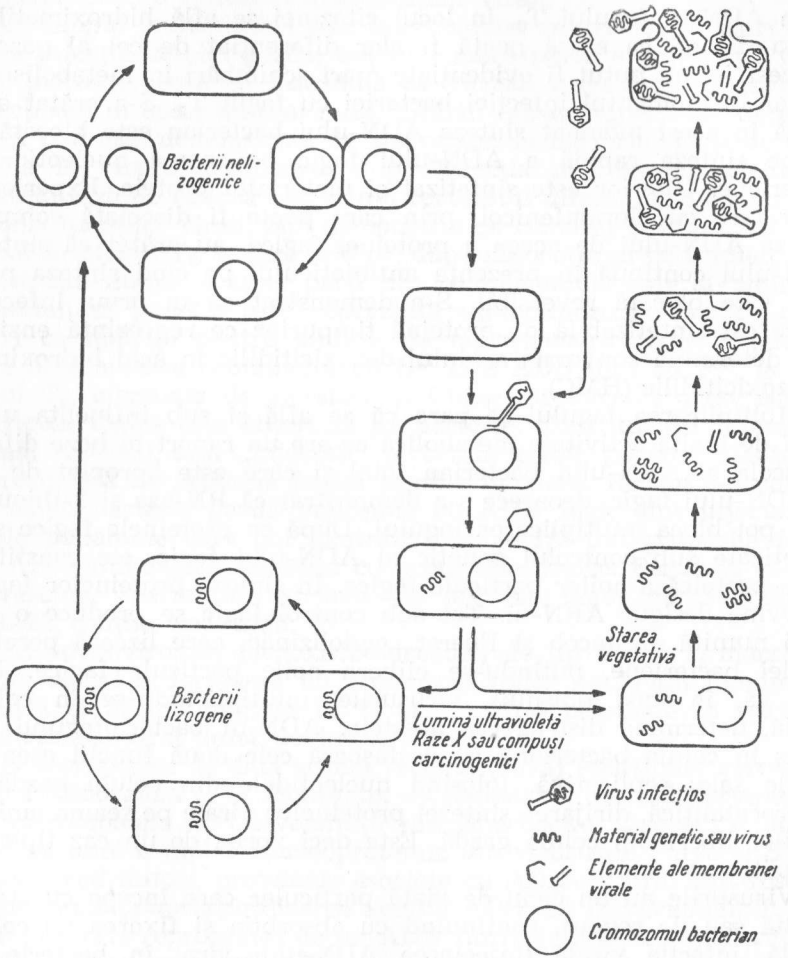


Fig. 53 — *Ciclul de viață al bacteriofagului.* După ce materialul genetic al virusului a pătruns într-o celulă gazdă bacteriană, aceasta poate fi distrusă atunci cînd virusul intră în stare vegetativă (dreapta) formînd numeroase particule virale infecțioase care ies din celula bacteriană prin procesul numit liză (ciclul litic). În partea stîngă se figurează calea care duce la ciclul lizogenic în care genele virale se atașază de cromozomul bacterian devenind provirus (profag) stare în care particula virală este neinfecțioasă, iar celula bacteriană este viabilă. Diferiți agenți fizici sau chimici pot însă determina scoaterea particulei virale din ciclul lizogenic și să o treacă în ciclul litic.

particulei virale, materialul necesar, nucleotide, aminoacizi, enzime, ARN-t și ribozomii, pe cînd virusul participă doar cu ADN-ul (în cazul adenovirusurilor) sau cu ARN-ul (în cazul ribovirusurilor) care conțin informația genetică necesară replicării și sintezei proteice virale. Proteina „precoce" sintetizează sub controlul genoforului viral inițial, pe lîngă rolul amintit în conversia acidului dezoxicitidilic în acid hidroximetilcitidilic intervine și în inhibarea replicării ADN și ARN bacterian ca și a sintezei proteinelor bacteriene. Proteinele „tardive" sînt sintetizate sub controlul noilor molecule de ADN fagic, reprezintă proteine structurale, intrînd în alcătuirea capsidei, și proteine enzimatice, cu rol în ansamblarea, maturarea și eliberarea virusului din celula gazdă.

Cînd o bacterie este infectată de două sau mai multe tipuri de fagi care sînt înrudiți, dar diferă prin cel puțin doi markeri genetici, descendența fagică, în parte, este alcătuită din particule fagice care au markerii moșteniți de la două sau mai multe tipuri de particule fagice. Markerii genetici (genele) au în cazul virusurilor un aranjament liniar fiind dispuși într-un singur grup de linkaj. Cromozomul viral se poate însera în cromozomul bacterian, uneori în regiuni specifice subordonîndu-se comportamentului cromozomului bacterian, replicîndu-se sincron cu acesta. Acest cromozom viral integrat cromozomului bacterian poartă denumirea de profag (Fig. 54), iar bacteriile purtătoare de profagi se numesc bacterii lizogene. Virusurile care pătrund în celula gazdă se numesc virusuri litice.

Există o specificitate a localizării în organitele celulare a virusurilor. Replicarea ribovirusurilor se realizează de obicei în citoplasma celulei gazdă pe cînd aceea a adenovirusurilor se realizează preponderent în nucleul acesteia. Virusul influenza la început se află în citoplasmă, după infecție, pentru ca apoi să fie intim asociat cu membrana nucleară. La poliovirus, antigenul viral este inițial decelat în citoplasmă, la o oră de la infecție, după care apare în nucleu. Maturarea virusului herpes are loc în nucleu, de unde migrează în citoplasmă. Procesul de replicare a virusurilor se desfășoară prin intermediul polimerazelor caracteristice virusului considerat iar timpul de replicare este o funcție a mărimii lanțului polinucleotidic. El este mai scurt la virusurile cu ARN monocatenar și mai mare la cele cu ARN dublu catenar sau cu ADN.

La ribovirusuri, ARN-ul viral funcționează deopotrivă ca matriță pentru sinteza noilor molecule de ARN viral, sub influența ARN-polimerazei, și ca translator al mesajului genetic în procesul de sinteză proteică prin care se sintetizează proteinele structurale ale capsidei și ARN-polimeraza.

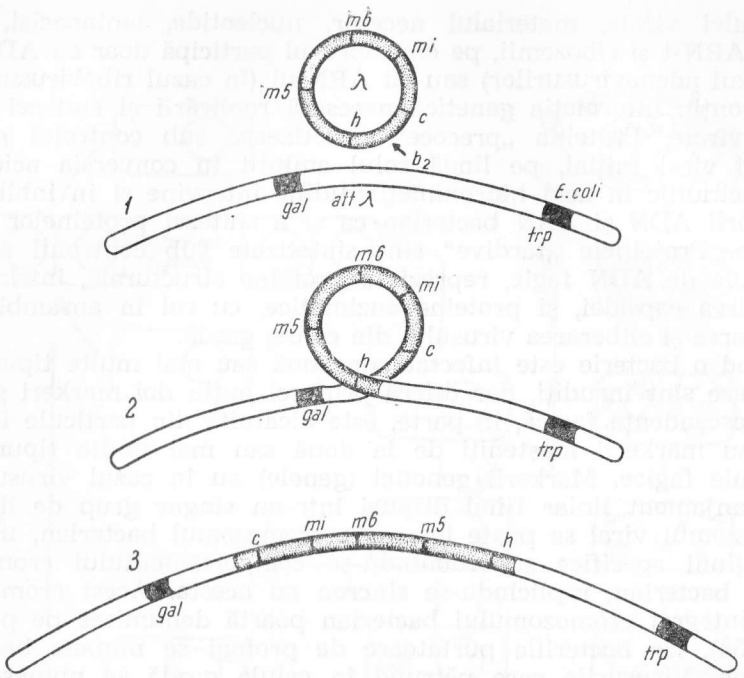


Fig. 54 — *Inserția profagului în cromozomul bacterian.* Cromozomul circular a fagului vegetativ lambda (*1*) face sinapsă cu regiunea de atașare lambda a cromozomului bacterian (*2*). Cromozomul fagic se rupe între genele h și c din regiunea b_2 pe cînd cromozomul bacterian se rupe între genele gal și trp. Are loc reunirea porțiunilor heteroloage (*3*). În urma acestui proces de rupere-reunire (crossing-over) rezultă o structură genetică continuă care conține genomul lambda intercalat între genele bacteriene gal și trp. (din G. S. Stent 1971).

Există și o categorie de virus sau fag temperat, numită încă profag, care infectează celulele bacteriene în genoforul cărora va fi inclus ADN-ul viral dar distrugerea unor asemenea celule bacteriene este foarte rară sau nu are loc niciodată în urma infecției fagice. ADN-ul fagului temperat se multiplică și devine fag latent (profag) care este incorporat în „cromozomul" bacterian, activitatea sa fiind parțial inhibată, genele care mai rămîn în stare de funcționare neputînd determina trecerea virusului în stare vegetativă activă. Integrarea fagului în genomul bacterian este un fenomen recombinatoriu realizîndu-se în esență printr-un crossing-over, în urma fenomenului de rupere-reunire. Asemenea bacterii care conțin

în genoforul lor ADN-ul viral al profagului și pe care îl pot transmite la descendenți, s-au numit bacterii lizogene. Genomul fagului poate acționa ca o secvență a genelor bacteriene, conferind anumite trăsături fenotipului bacterian. În cazul acestor bacterii lizogene se realizează un sistem complex bacterie-virus, ADN-ul viral replicîndu-se sincron cu cel bacterian, transmițîndu-se la bacteriile fiice și făcînd ca bacteriile acestea lizogene să devină rezistente la infecții ulterioare cu virusuri de același tip. Uneori genoforul fagului vegetativ, provenit din infecție sau din inducția profagului se poate replica cu o viteză mai rapidă decît genomul bacterian, și chiar să blocheze funcția nucleoidului bacterian. Dar din profag, bacteriofagul poate trece în fag virulent prin căpătarea independenței ADN-ului fagic, care se desprinde din genoforul bacterian. În timpul desprinderii ADN-ului fagic din cel bacterian, poate să antreneze cu el și mici segmente de ADN bacterian. Infectînd noi bacterii, el conferă noilor celule infectate caracteristici specifice gazdei inițiale în care s-a aflat ca profag. Acest fenomen s-a numit transducție.

La virusurile animale, eliberarea din celula gazdă este diferită de aceea a bacteriofagilor. Celulele animale infectate sînt capabile să „secrete" particule virale mult timp, aparent fără dereglări notabile ale celulei.

Virusul matur apare ca o particulă inertă ce are proprietatea de a cristaliza. Complexitatea particulelor virale nu poate fi comparată cu aceea a celulelor vii, fiind în esență lipsite de sisteme enzimatice și de sinteză. Singura activitate enzimatică a particulei virale este aparent legată de penetrația în celula gazdă. Multiplicarea particulei virale este dependentă în totalitate de metabolismul celulei gazdă. Replicarea ADN-ului monocatenar al unor adenovirusuri se realizează în celula gazdă prin trecerea sa sub formă temporală dublu-catenară, prin stabilirea unor punți de hidrogen între catena inițială ce a pătruns în celula gazdă și noua catenă sintetizată după pătrunderea genoforului fagic în celula bacteriană. Prin desfacerea punților de hidrogen ale catenei duble, catena nou sintetizată servește drept matriță pentru sinteza unei noi molecule de ADN monocatenară care participă la realizarea de particule fagice noi. Acestea conțin în ADN-ul lor exact aceeași secvență de baze pe care a avut-o și molecula inițială de ADN fagic în momentul pătrunderii în celula gazdă. Se asigură astfel o continuitate fidelă a secvențialității bazelor din ADN-ul viral cu semnificație majoră în transmiterea caracteristicilor particulelor infecțioase de-a lungul generațiilor.

În cazul ARN-ului viral, de la ribovirusuri, acesta pătrunzînd în celula gazdă se asociază cu ribozomii. Are loc sinteza unei enzime numită ARN-sintetază care intervine în replicaţia ARN-ului viral. ARN-ul viral din monocatenar devine bicatenar. Catena nou-sintetizată devine matriţă pentru sinteza noilor molecule de ARN viral monocatenar. Proteinele virale noi sînt sintetizate la nivelul ribozomilor din celula gazdă în urma asocierii acestor ribozomi cu noile molecule de ARN viral. Are loc ansamblarea particulelor fagice progene din ARN şi proteine. Aflate la interferenţa materiei vii şi materiei inerte, virusurile au constituit, alături de bacterii, un excelent obiect de studiu, pe baza căruia au fost postulate cele mai multe din tezele geneticii moleculare.

Capitolul VI

ORGANIZAREA GENETICĂ PROCARIOTĂ ŞI MODALITĂŢILE DE REPLICARE ŞI DIVIZIUNE

Organizarea genetică procariotă caracterizează microorganisme cu structură celulară la care însă nu s-a realizat o delimitare netă între citoplasmă şi materialul genetic printr-o formaţiune cum ar fi de pildă membrana nucleară dublă electronoptic, de la nucleul organismelor eucariote. Din această cauză contactul dintre citoplasmă şi genofor este direct, genoforul fiind în consecinţă liber în citoplasmă. Din această categorie de microorganisme procariote fac parte bacteriile, actinomicetele şi algele albastre — cianoficee. Ca şi alte organisme, bacteriile şi cianoficeele conţin ADN ca purtător al informaţiei genetice. Complementul de ADN din fiecare celulă îndeplineşte efectiv toate funcţiile nucleului luînd parte în procesele de schimb genetic implicat în recombinare. În esenţă, mecanismele acţiunii genetice sînt asemănătoare cu cele de la organismele eucariote. Ca şi la eucariote păstrarea continuităţii genetice într-o linie clonală de celule procariote depinde de asocierea succesivă a două procese: replicaţia exactă (fidelă) a informaţiei genetice şi o precisă distribuire a produşilor de replicaţie, procese ce decurg într-o manieră în esenţă asemănătoare la toate organismele vii.

Problema replicaţiei materialului genetic poate fi sinonimă cu problema replicaţiei macromoleculei de ADN, la organismele procariote la care ADN-ul nu este asociat cu histonele. La organismele eucariote, la care există cromozomi în care ADN-ul este asociat cu proteinele bazice, problema replicaţiei include şi replicaţia părţii proteice din complexul nucleohistonic, din care cauză replicaţia moleculei de ADN nu se suprapune întocmai replicaţiei cromozomului. Mecanismul de bază molecular al replicaţiei informaţiei genetice este însă asemănător la toate organismele, inclusiv la virusuri. Includerea în acelaşi grup — procariote — a bacteriilor şi cianoficeelor, se bazează nu numai pe raţiuni de organizare nucleară procariotă, ci şi pe afinităţi legate de chimia membranei şi loca-

lizarea pigmenților fotosintetici și respiratori. Unii consideră că relațiile dintre bacterii și cianoficee sînt de așa natură încît este dificil a stabili o linie de demarcație netă între aceste două grupe de microorganisme. Uneori și morfologia externă a unor bacterii amintește pe aceea a unor alge albastre. De pildă, Beggiatoa poate fi considerată o algă albastră apoclorotică din genul Oscillatoria.

La fel ca la virusuri, și la bacterii și cianoficee, ADN-ul este singura structură macromoleculară care îndeplinește funcția nucleului eucariotelor. De acest ADN al procariotelor se pot atașa permanent sau temporar, de-a lungul moleculei sale dublu catenare, în anumite locuri, unele substanțe macromoleculare sau molecule mici și ioni. Lipsesc membrana nucleară și aparatul mitotic fără a fi afectate funcțiile esențiale ale acestor organisme procariote deoarece întregul lor genom apare ca un singur grup de linkaj. Baza fizică a acestui singur grup de linkaj este reprezentată de genofor-molecula de ADN.

În marea lor majoritate, bacteriile și algele albastre cu celulă mică sînt monoenergide — conținînd un singur complement genetic pe celulă. Unele bacterii și marea majoritate a algelor albastre cu celulă mare sînt polienergide, adică conțin mai multe complemente genetice în celulă. Polienergidia procariotelor este analoagă poliploidiei eucariotelor ca semantică.

Genoforul procariotelor reprezintă în fond un duplex de ADN de 1/100—1/1000 din lățimea celulei bacteriene sau de alge albastre, care niciodată nu atinge gradul său maxim de dispersie. ADN-ul este concentrat în anumite locuri ale celulei și aceste locuri prezintă o formă variabilă apărînd sub forma unei rețele delicate de filamente sau ca un corp compact. Singurul element structural al acestor zone este ADN-ul și din această cauză aceste structuri au fost denumite ADN-plasmă. După Kellenberger acest termen nu trebuie confundat cu nucleoplasma eucariotelor, aceasta din urmă reprezentînd sucul nuclear. Orice porțiune coerentă de ADN-plasmă reprezintă cel puțin un genom — un set complet de informație genetică. Acest set, în fond o entitate nucleară — reprezintă un grup de înlănțuire și corespunde unui cromozom de la eucariote. Asemenea entități au fost numite nucleoizi la bacterii și cromatinozomi la algele albastre. Lipsiți de membrană nucleară, nucleoizii adiacenți pot să se unească pentru a forma structuri mai complexe. În aceeași celulă, mai ales la cianoficee pot exista mai mulți cromatinozomi al căror ansamblu formează aparatul cromatinic sau cromatinomul.

A. BACTERII

În 1925, s-a evidențiat pentru prima dată, pe baza reacției nucleare Feulgen, prezența ADN-ului la bacterii, la nivel microscopic. Ulterior, prin degradarea enzimatică și autoradiografie, a fost confirmată prezența ADN-ului în celula bacteriană.

În ADN-ul bacterian, ce corespunde structural modelului Watson-Crick, cu molecule helicoidale, dublu-catenare, perechile G—C reprezintă 25—75%. Cantitativ, la Eubacteria, ADN-ul variază între $1{,}0\times10^{-15}$ și $2{,}0\times10^{-14}$ g/celulă. O cantitate mai mare de ADN pe celulă se înregistrează atunci cînd ADN-ul se află în stare de replicație sau cînd în celulă se află mai multe complemente genetice.

Cromozomul bacterian este localizat la nivelul nucleoplasmei fără a se ști precis dacă toate fibrilele nucleoplasmei (ADN-plasmă) sînt părți ale aceleiași macromolecule de ADN, adică ale unei singure macromolecule de ADN.

La microscopul electronic, ADN-ul bacterian prezintă un model bidimensional, lipsit aparent de capetele libere și ramificația fibrilară. Molecula aceasta neramificată de ADN bacterian prezintă bucle, ce pornesc dintr-o arie centrală a protoplastului celulei. Moleculele de ADN la Escherichia coli au o lungime de 1.100—1.400 μm și o masă moleculară de 2.10^9. La Micrococcus lysodeikticus, ADN-ul se prezintă sub forma unui filament întortocheat la care s-au putut evidenția capetele libere. Taylor și Adelberg, arată că cromozomul unic bacterian prezintă o formă inelară, de buclă închisă, formă care corespunde cineticii procesului de conjugare, de transferare a genelor de la donor la receptor și evită atacul cu dezoxiribonuclează care poate avea loc numai asupra unei molecule cu capete libere.

Replicarea cromozomului bacterian se realizează după modelul semiconservativ al lui Watson, Crick, Delbrück și Stent, și a fost dovedită de Meselson, Stahl și Cairns.

Replicarea secvențială a ADN-ului cromozomului bacterian începe într-un singur punct numit punct de origine. Replicația începe de aici și pornește cu viteză uniformă. Datorită replicației continue desfășurată cu viteză uniformă, genoforul își păstrează forma sa circulară în timpul replicației. Sinteza ADN-ului este sincronă cu diviziunea celulară. Cairns a demonstrat autoradiografic, că are loc separarea imediată a duplex-urilor fii, fapt cerut de continuitatea procesului de replicație a cromozomului bacterian, un ciclu de replicație urmîndu-i altuia fără întîrziere. Punctul de replicație este marcat de apariția bifurcației cromozomului bacterian prin care are loc separarea fizică a moleculelor noi de ADN, la care o catenă este de proveniență parentală, iar cealaltă este nou-

sintetizată (tipul semiconservativ de replicare). Dacă structurile liniare de ADN capătă în timpul replicației forma literei Y, în cazul cromozomului (ADN-ului) bacterian nu apare această configurație, deoarece el își păstrează în timpul replicației forma sa circulară inițială. Se apreciază că intrarea în funcțiune a unui punct de replicație pe cromozomul bacterian anihilează pe toate celelalte puncte potențiale de replicație.

Sinteza ADN-ului, la bacteriile ce cresc rapid, este practic un proces continuu. Ea este liniară în raport cu timpul dar poate fi încetinită în condiții de nutriție suboptimă, cînd are loc replicarea alternativă a nucleoizilor, reducerea intensității de sinteză și sinteza intermitentă. În condiții normale, la terminarea unui ciclu de replicare începe un nou ciclu de replicare.

Susa de Escherichia coli, 15 T⁻ met⁻ try⁻, pe mediu mineral cu glucoză, își dublează numărul de celule în 40′. Celulele conțin doi nucleoizi. Ei se replică continuu și simultan. În mediu cu succinat, timpul de dublare este de 70′, reducîndu-se corespunzător viteza de sinteză a ADN-ului. Pe mediu cu succinat, cei doi nucleoizi se replică alternativ. Crescută pe mediu cu asparat, timpul de dublare a crescut la 120′. Pe mediu cu prolină sau acetat,timpul de dublare ajunge la 180′—270′, iar singurul său nucleoid se replică numai în a doua jumătate a ciclului celular.

Uneori sinteza ADN-ului poate fi terminată înainte de diviziunea celulară. Astfel Clark și Maale, în 1967, în experiențe autoradiografice, au constatat că la E. coli, susa B/r, replicația începe cu 20′—30′ înainte de diviziunea celulară. Dar, diviziunea nucleoidului, în anumite cazuri, este completată abia atunci cînd celulele fiice sînt separate de peretele celular.

Replicarea oricărui segment al genoforului este imediat urmată de separarea structurilor duplexe fii și de încorporarea lor în entitățile nucleare (nucleoizi) ce pot deveni fizic separate fără întîrziere.

Punctul de inițiere a replicației „cromozomului" bacterian deschide dublul helix de ADN prin ruperea punților de hidrogen și funcționează ca „pivot" pentru despiralizarea porțiunii din ADN nedesfăcute.

Pentru sinteza ADN-ului este necesară prezența anumitor aminoacizi. În lipsa lor ea se desfășoară cu viteză scăzută. Pentru sinteza ADN-ului bacterian cu alte cuvinte, sînt necesare proteine care nu sînt imediat și permanent asociate cu ADN-ul. S-a constatat că punctul de începere a replicației în ciclurile subsecvente rămîne același. La E. coli nici chiar cloramfenicolul nu s-a dovedit atît de eficient în blocarea inițierii noilor cicluri de sinteză a ADN-ului precum s-a dovedit a fi lipsa anumitor aminoacizi.

În timpul creșterii rapide, la Bacillus subtilis, apare o replicare multifurcată la ambele structuri fiice (replicație dicotomică).

Repliconul, termen propus de Jacob și Brenner, în 1963, reprezintă „unitate autonomă de replicație", reprezentată de o moleculă de ADN capabilă de a se replica sub controlul propriu (autocontrol). Repliconul este alcătuit din ADN și grupele funcționale sau elementele asociate fizic cu el. Întregul genom de E. coli este organizat ca un singur replicon. Dacă genoamele de fagi sau elemente genetice specializate, prezente în citoplasma celulei bacteriene, precum epizomii, se integrează în genomul bacterian (prin recombinare), replicarea lor se va realiza sub controlul grupului funcțional al genomului bacterian. Grupul funcțional care controlează replicația segmentului de ADN exogen sau repliconul, la care acesta este atașat, s-a numit replicator. El reprezintă locul de acțiune al unei proteine specifice, inițiatorul. Interacțiunea replicator-inițiator determină replicarea unității replicative a ADN-ului. Epizomi ai bacteriei E. coli, factorul F și fagul lambda (λ) de lizogenie au capacitatea de a se replica independent numai cînd nu sînt integrați în cromozomul bacterian. Atunci însă cînd sînt integrați în acesta, replicarea lor este coordonată de mecanisme care dirijează replicarea cromozomului bacterian. În cazul cînd segmente din genoforul bacterian sînt asociate cu episomul, ele vor fi replicate sau transferate în timpul conjugării ca o parte integrantă a episomului. S-a arătat că nucleoidul și episomul F pot fi distribuiți în celulele fiice într-o manieră coordonată, asemănătoare coordonării cromozomilor în mitoză. Replicatorul ar fi analog genei operatoare din cadrul reglajului sintezei proteice. Cînd celula este pregătită pentru diviziune, de la nivelul membranei citoplasmatice (care joacă un rol important în procesul de diviziune) vin semnale care sînt recepționate de inițiator. Are loc activarea replicatorului care duce la replicarea macromoleculei de ADN (Fig. 55).

Mulți autori au implicat membrana celulară sau peretele celular în diviziunea nucleoidului și segregare. Nucleoidul poate fi atașat de stratul cel mai intern al peretului celular, adică de membrana citoplasmatică. Prin marcarea membranei cu telurit, Ryter a demonstrat, în 1967, că replicarea ADN-ului la Bacillus subtilis și creșterea peretelui celular sînt sincrone. Diviziunea nucleoidului și diviziunea celulară sînt strîns interdependente. Diviziunea celulară este sub controlul informației specifice care este exprimată în timpul replicației nucleoidului. Între nucleoid și membrana celulară se stabilesc legături prin intermediul unor structuri care s-au numit mezozomi sau plasmalemozomi — ce reprezintă locuri de ancorare mecanică pentru nucleoid cu rol în separarea nucleoizilor

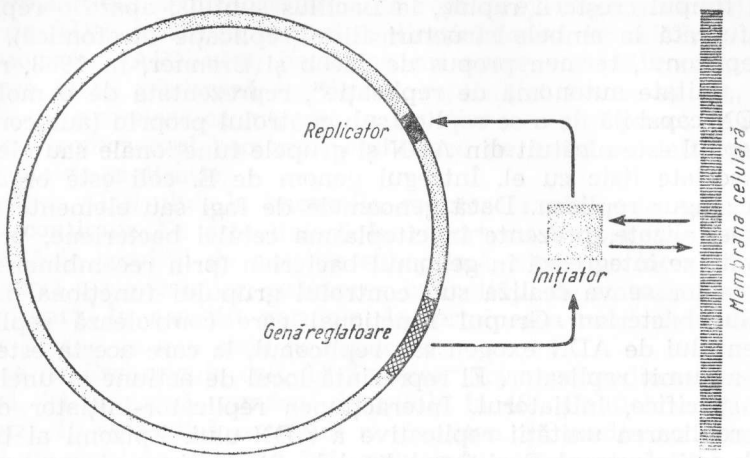


Fig. 55 — *Replicarea ADN-ului cromozomului bacterian,* poate fi sub un control asemănător cu acela al reglajului sintezei proteice: O genă reglatoare controlează sinteza unui „inițiator" (primind un semnal probabil de la membrana celulară) care îl face să acționeze asupra „replicatorului".

fii în diviziune. Aceste structuri provin din invaginarea membranei citoplasmatice și sînt prezente în tot ciclul celular mai puțin în stadiul de spor cînd nucleoidul ia contact direct cu membrana citoplasmatică. La bacterii Gram-negative, punctele de contact între corpurile nucleare și membrana citoplasmatică sînt stabilite întotdeauna fără intermediul plasmalemozomilor, locul de atașare a nucleoidului pe membrana periferică este echivalent cu cel de pe suprafața plasmalemozomului. Admițînd că segmentul de ADN, atașat de membrană direct sau prin intermediul plasmalemozomului, este un operon, acesta este activ implicat în sinteză de material membranar. Poate avea loc atașarea de membrană a unui singur segment din ADN sau operon al genoforului sau a mai multor segmente din ADN separate de segmente neatașate. Atașarea într-un singur punct este legată însă de mecanismele replicației genomului și ale segregării. Segmentul din genofor asociat cu membrana poate fi originea replicației, a complexului de replicație, adică a bifurcației de replicație. Atașarea în mai multe puncte presupune specializarea anumitor segmente ale genoforului, care pot servi ca ancoră mecanică pentru mișcările întregului nucleoid, dar în același timp pot reprezenta zone de funcționare a mecanismelor replicației nucleoidului. Diviziunea celulară este afectată de agenți care interferă cu sinteza peretului celular. Segregarea cromozomilor bacterieni în celulele fiice este realizată prin contactul intim dintre ei și mezozomii fii, care iau naștere prin dedublarea mezozomului inițial. Iată deci că aici funcția aparatului mitotic de segregare anafazică de la eucariote este îndeplinită de interacțiunea cromozom bacterian — mezozom și duce în ambele cazuri la repartizarea produșilor de replicație în celulele fiice. Prin sinteză progresivă de membrană citoplasmatică ia naștere un sept transversal care separă mezozomii fii și repliconii atașați de ei în două celule fiice.

Nucleoidul bacterian este capabil să funcționeze simultan ca „nucleu în replicație și ca nucleu în lucru" mecanismele ce controlează transcripția nefiind afectate de procesul de replicare. Transcripția mesajului genetic în ARN-m implică ca și la virusuri doar un singur lanț (catenă) de ADN, apărînd complexe ADN—ARN în timpul trascripției, complexe care sînt tranzitorii. ADN-ul bacterian nu este asociat în mod normal cu proteinele bazice, dar se admite că el poate fi neutralizat de unele molecule mai mici și ioni precum cei de magneziu, calciu, mangan, di- și poliamine de tip NH_2 $(CH_2)n$ NH_2 și de tip spermină și spermidină, ca și de complexe cu poliaminoacizi, precum polilizină. Uneori ionii de mercur, argint și cupru reacționează preferențial cu grupele amino din ADN.

Absența dezoxiribonucleohistonelor este o caracteristică pentru bacterii și cianoficee și după cum se va vedea și pentru dinoflagelate dintre eucariote, din care cauză algele dinoflagelate formează grupa mezocariotă. În secțiuni ultrafine, la microscopul electronic se poate evidenția ușor diferența în caracteristica chimică a ADN-ului celulelor procariote și mezocariote în comparație cu cele eucariote. În celulele procariote nu s-a putut evidenția prin aceste tehnici modelul fibrilelor groase de 35—40 Å de nucleohistone și al fibrilelor de grosime dublă de 100 Å care sînt caracteristice nucleilor celulelor eucariote. La procariote apare un model de molecule individuale de ADN, neasociate cu histonele, care sînt mai mult sau mai puțin agregate. Extrăgînd fracțiunea histonică din dezoxiribonucleohistonele eucariotelor, Ris a observat că preparatul își modifică aspectul începînd să semene cu ADN-plasma bacteriilor, cianoficeelor și dinoflagelatelor. Nici modelul de difracție în raze X al nucleohistonelor nu a putut fi decelat la aceste microorganisme. Atunci cînd, uneori, ADN-ul bacteriilor este asociat cu substanțe proteice, s-a demonstrat că fracțiunea proteică nu este de tipul histonelor. Proteinele bazice însă apar la bacterii asociate cu alte fracțiuni decît acizii nucleici, bunăoară cu acidul fosfatidic sau alte lipide, așa cum s-a evidențiat la Staphilococcus epidermidis. S-a constatat că la Pseudomonas, putrescina este în mod primar asociată

cu ADN-ul şi cu ARN-ul neribozomal. Am văzut că şi la bacteriofagi există asemenea asocieri între ADN-ul fagic şi substanţe neutralizatoare, altele decît proteinele bazice histonice.

Asocierea ADN-ului cu asemenea compuşi are o deosebită importanţă pentru starea sa fizică, putînd să faciliteze schimbările acesteia, ca şi modificarea formei nucleoidului, legată de injectarea sa la bacterii, în cazul virusurilor, de replicarea rapidă şi segregarea genoamelor şi de legătura cu mezozomii în cazul bacteriilor şi după cum vom vedea, de raporturile cu membrana nucleară în cazul dinoflagelatelor.

Nucleoidul bacterian apare ca o structură citologică corespunzătoare unui complement genetic sau genom aflat în stare de repaus nu de replicaţie. Cel puţin la unele bacterii, genomul este o singură macromoleculă de ADN. Dar adesea nucleoidul apare ca o

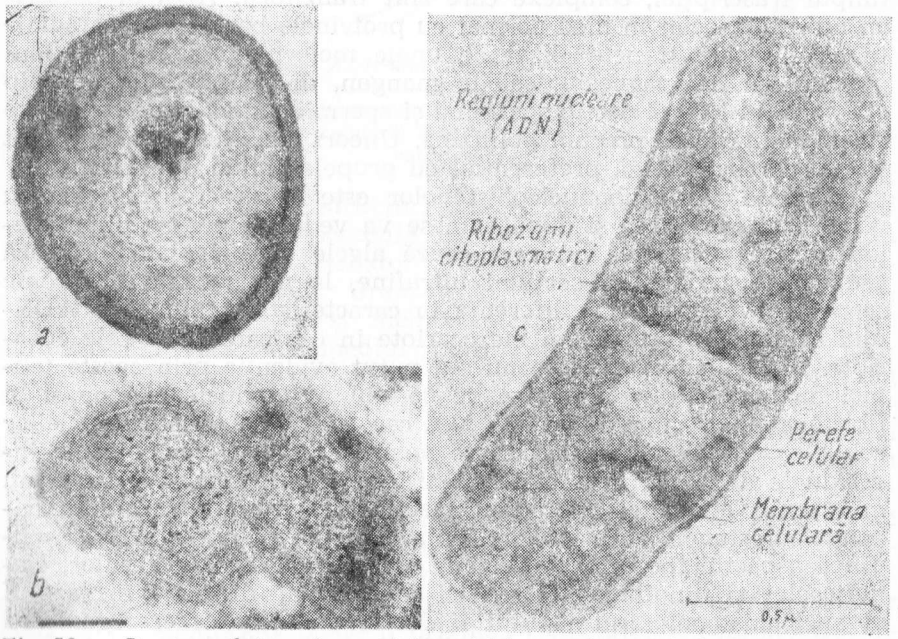


Fig. 56 — *Structura electronmicroscopică a celulei procariote de tip bacterian. a.* Celulă de Staphylococcus aureus în diviziune: din membrana celulară porneşte un sept de pe pereţii opuşi spre centrul celulei. În centru materialul genetic (cromozomul bacterian = nucleoidul bacterian) este legat de mezozom. 1 : 120.000 (după H. Ruska, 1973); *b.* Mycoplasma sp. secţiune ultrafină prin celula aflată în diviziune. Materialul nuclear cu organizare de tip bacterian-ADN-plasmă. Scala 0,1 μm. (după van Iterson şi Robinow, 1961, din G. W. Fuhs, 1969). *c.* Electronmicrografia unei celule de tip procariot (Bacillus subtilis, după Robinow şi J. Marak, din G. S. Stent. 1971).

reţea sau un sistem similar de filamente interconectate de catene de ADN, nedelimitat de o membrană nucleară (Fig. 56). Analiza electronmicroscopică arată că nucleoizii sînt structuri alungite, alcătuite din filamente axiale, reprezentate de macromolecule de ADN. Fibrele de ADN prezintă un paralelism pronunţat, fiind distribuite în ADN-plasmă. Spre deosebire de ceea ce se întîmplă la organismele superioare, ciclul celular la bacterii nu este însoţit de o condensare temporală a materialului nuclear. Replicarea nucleoidului şi diviziunea reclamă o aranjare spaţială specifică redusă, fiind procese simple de separare ce se desfăşoară în esenţă la nivel molecular (Fig. 57).

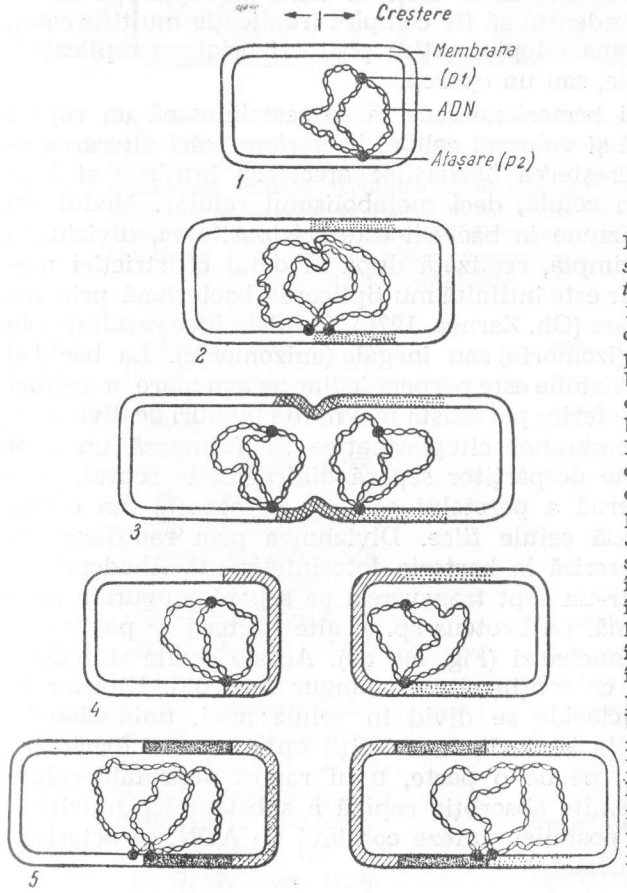


Fig. 57 — *Mecanismul de separare a cromozomilor bacterieni fii în celulele fiice. 1.* Celula bacteriană are un cromozom circular replicat parţial şi ataşat de membrana celulară. (p_2) Replicarea începe în p_1, în celula bacteriană parentală; *2.* Replicarea cromozomului circular s-a terminat şi cele două replici circulare au puncte separate de ataşare; *3.* Ambele replici circulare sînt deja parţial replicate înainte de a fi distribuite în două celule fiice; *4.* Celula bacteriană s-a divizat în două celule fiice prin înaintarea unui sept între punctele de ataşare la membrana celulară a genoamelor parţial replicate; *5.* Diviziunea celulară a celulelor fiice. Prin creşterea membranei noi (în negru) punctele de ataşare a cromozomilor fii se deplasează spre centrul celulei.

Fibrilele de ADN la bacili prezintă o orientare mai mult sau mai puţin paralelă cu axa lungă a celulei. La unele bacterii sporogene, în timpul germinării sporilor, dispunerea fibrilelor de ADN are aspect penat, la nivelul nucleoidului, aşa cum se întîlneşte şi la dinoflagelate, în cromozomi, dar fără rigiditatea regulată observată la acestea.

Trascripţia, replicaţia şi segregarea genomului procariotelor se pot desfăşura simultan, fără reorganizări majore aparente, spectaculare precum condensarea şi despiralizarea ciclică a cromozomilor evidenţiată la eucariote.

Replicarea ADN-ului procariotelor este însoţită de segregarea helicelor fiice. Nu este exclus ca un nou ciclu de replicaţie să fie iniţiat înainte ca precedentul să fie complet (replicaţie multifurcată). Contactul cu membrana citoplasmatică poate fi originea replicaţiei, bifurcaţia de replicaţie, sau un operon.

Diviziunea celulei bacteriene face să se restabilească un raport optim între suprafaţă şi volumul celulei bacteriene, căci alterarea acestui raport, prin creşterea bacteriilor afectează intrările şi ieşirile de substanţe din celulă, deci metabolismul celular. Modul cel mai frecvent de diviziune la bacterii este sciziparitatea, diviziunea directă, binară sau simplă, realizată după modelul constricţiei mediane (Fig. 56). Mai rar este întîlnită multiplicarea bacteriană prin înmugurire sau ramificare (Gh. Zarnea, 1970). Celulele fiice rezultate din diviziune pot fi egale (izomorfe) sau inegale (anizomorfe). La bacilii şi spirilii, planul de diviziune este perpendicular pe axa mare a celulei (Fig. 58). La bacteriile sferice pot exista mai multe planuri de diviziune. Prin invaginarea membranei citoplasmatice se formează un sept transversal. Un perete despărţitor separă diafragmatic septul, pornind de pe faţa internă a peretelui celular. Se separă, din celula mamă bacteriană două celule fiice. Diviziunea prin ramificare şi înmugurire a fost descrisă la bacteria fotosintetizantă Rhodomicrobium vannielli. Printr-un sept transversal se separă mugurele nou-format de celula mamă. La Proteus sp. şi alte bacterii se pot forma celule cu mai mulţi nucleoizi (Fig. 59, 60). Aceste celule sînt derivate din celule mici ce conţin cîte un singur nucleoid. Ulterior aceste celule multinucleoide se divid în celule mici, uninucleoide. Ritmul de diviziune la bacterii, în condiţii optime, este foarte intens; el este datorat, pe de o parte, unui raport suprafaţă-volum foarte mare, care permite absorbţia rapidă a substanţelor nutritive, iar pe de altă parte, posibilei sinteze continui de ADN, caracteristică pentru toate procariotele.

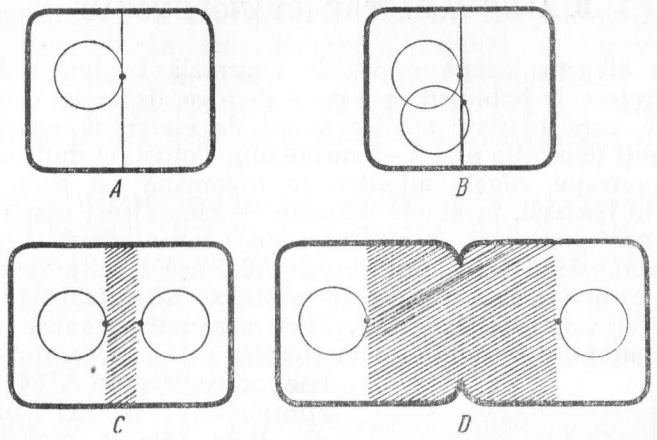


Fig. 58 — *Rolul membranei celulare în replicarea cromozomului bacterian* este demonstrat de legătura cromozomului bacterian circular cu membrana celulară (*A*). Un semnal ce este generat la nivelul membranei iniţiază replicarea cromozomului bacterian (*B*). Prin creşterea membranei se separă punctele de ataşare (*C*) pînă cînd celula este gata de diviziune (*D*). Diviziunea celulei se face prin înaintarea unui sept în planul perpendicular, pe axa mare a celulei bacteriene (*D*).

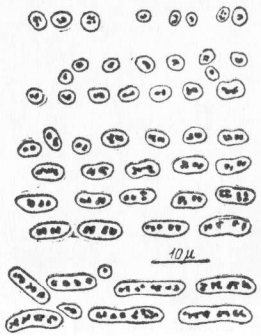


Fig. 59 — *Structura microscoptică a nucleoizilor bacterieni.* Secvenţă de faze ale germinării sporului şi creşterii la Bacillus megaterium (după Robinow, din G. W. Fuhs, 1969).

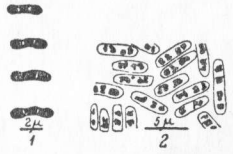


Fig. 60 — *Achromobacter sp. 1.* secvenţa de microfotografii în contrast de fază la celulele în diviziune. Nucleoizii apar ca bare orientate transversal (după Robinow, 1956, din G. W. Fuhs, 1969). *2. Nucleoizi de Bacillus cereus,* orientaţi transversal, avînd în timpul diviziunii formă de „V" (după C. F. Robinow, din G. W. Fuhs, 1969).

B. ALGE ALBASTRE (CYANOPHYCEAE)

Algele albastre ocupă o poziţie anormală în lumea biologică. Ele sînt tratate de botanişti ca o clasă de alge, deoarece sînt fotosintetizatoare, care folosesc apa ca donor de electroni, conţinînd doi fotopigmenţi (clorofila a şi β — carotenul). Totuşi de mult se ştie că, după organizaţie, algele albastre se aseamănă cu bacteriile.

Ca şi la bacterii, la algele albastre — cianoficee, materialul genetic nu este organizat la nivelul unui nucleu adevărat (Fig. 61). Lipsesc cromozomii tipici, membrana nucleară şi alte structuri accesorii ce caracterizează nucleul eucariotelor. Nu există de asemenea aparat mitotic, fus de diviziune. Microscopia electronică a demonstrat că materialul genetic al cianoficeelor este reprezentat de fibrilele moleculare de ADN, orientate aproximativ paralel unele faţă de altele, într-un model nuclear flexibil (Fig. 62).

La microscopul electronic s-a demonstrat că regiunile care nu

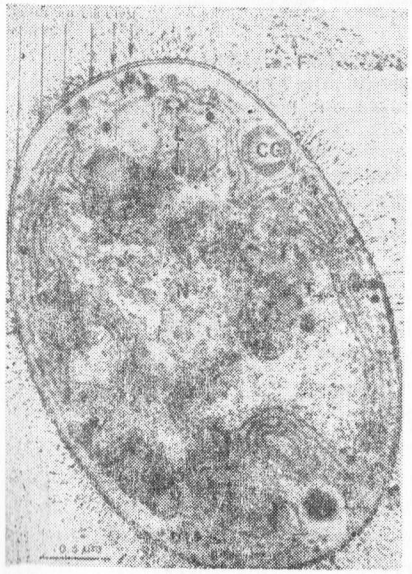


Fig. 61 — *Imaginea electronmicroscopică a unei celule de Anabaena variabilis* în care se pot vedea: mucilagiul (M), straturile peretelui celular ($L_I - L_{IV}$) plasmalema (Pl), tilacoidele (T), regiunile ce conţin ADN (N) cu fibrile fine (F), granule de cianoficină (CG) cu corp poliedric (PB) şi incluziuni de natură lipidică (L). Medalion — fibrile fine de ADN din nucleoplasmă. (după L. V. Leak, din Walk, 1973)(×272.000).

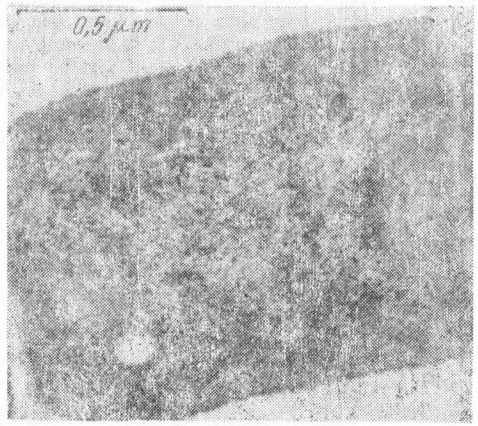


Fig. 62 — *Starea omogenă a ADN-plasmei la Phormidium calothricoides* (după M. R. Edwards, din G. W. Fuhs, 1969).

conţin membrane fotosintetice (tilacoide) sînt ocupate de ADN-plasmă. La specii precum Pseudanabaena catenata şi Anacystis nidulans, ADN-plasmă este concentrată într-o singură zonă centrală a celulei. La alte specii, materialul genetic însă, nu este aranjat în centru sau pe axa centrală a celulei sau un asemenea aranjament este temporar.

Bütschli a descris materialul cromatinian de la cianoficee, după colorare cu coloranţi bazici, ca o reţea de fibre cromatice, descriere care a fost confirmată de alţi cercetători, printre care Guilliermond (1933). Structurile nucleare ale cianoficeelor sînt Feulgen-pozitive şi au fost denumite de Spearing, aparat cromatinian. Prin degradare enzimatică s-a stabilit că acesta conţine ADN, deoarece el este dizolvat de dezoxiribonuclează.

Cromatinomul algelor albastre corespunde aparatului cromozomal de la eucariote. Cromatinomul cianoficeelor prezintă trei dispoziţii:

— cromatina condensată într-o masă compactă, unică, ce se divide sincron cu diviziunea celulei;
— cromatina poate fi separată în mai multe mase globulare numite cromatinozomi;
— cromatina poate fi foarte fragmentată sub formă de granule reunite de filamente de substanţă necromatiniană sub forma unei spirale complexe.

Diviziunea celulară se face prin bipartiţie şi începe prin diviziunea aparatului cromatinian (Fig. 63). De pe faţa internă a loculei (membrana celulară) se formează un perete care separă cele două celule fiice. Orice analogie între fazele de diviziune la cianoficee şi fazele mitozei este nejustificată. Ca şi la bacterii, forma şi aranjamentul acestor elemente nu suferă schimbări semnificative în timpul ciclului celular. După Guilliermond aceste filamente se divid prin fisiune transversală sau prin sciziune efectuată de înaintarea membranei celulare în formare. La Oscillatoria sp., Spearing a descris un aparat cromatinian format din cîteva elemente în formă de baghetă,

Fig. 63 — *Diviziunea aparatului cromatic la Cianoficee*: *a.* Phormidium favosum (după Guilliermond, 1926), *b.* Oscillatoria sp.: *1* — două celule în diviziune cu scindarea transversală a filamentelor longitudinale de cromatină; *2—12* — faze ale diviziunii (după Spearing, 1937); *c.* aparatul cromatinian la Schizothrix mülleri, (după Guilliermond, 1926) (din G. W. Fuhs, 1969).

orientate paralel cu axa principală a trichomului Numărul lor este variabil, de obicei între 5—7 pe celulă. În trichoamele ce cresc rapid, majoritatea celulelor se află în același stadiu de diviziune. Celulele fiice, rezultate din diviziune, sînt mai scurte. După formare, ele cresc mai lungi atingînd dimensiunile specifice pentru specia considerată.

Separarea a două celule fiice se realizează după modelul diafragmatic. De îndată ce celulele au atins dublul lungimii lor minime, iar peretele despărțitor este complet, se inițiază un nou ciclu de diviziune. Succesiunea neîntreruptă a ciclurilor de diviziune este asemănătoare cu aceea întîlnită la bacterii în timpul creșterii nerestrictive.

La Oscillatoria amoena, toate elementele cromatinomice baghetiforme sînt de aceeași dimensiune. În timpul creșterii celulei, două seturi de elemente se pot observa în fiecare celulă, fiecare set deplasîndu-se spre un pol al celulei devenind astfel aparatul cromatinian al unei celule fiice. La celulele ce se află la jumătatea drumului între două diviziuni succesive se poate remarca suprapunerea parțială a celor două seturi de elemente în porțiunea centrală a celulei. În zona periferică a celulei pot fi evidențiate elemente singulare. Au putut fi identificate cîte 4 sau cîte 8 elemente cromatice pe celulă la această algă. Observațiile microscopiei optice sugerează fisiunea longitudinală a elementelor cromatinice ca mod obișnuit de replicație. Aceste elemente cromatinice reprezintă seturi complete de informație genetică, fiecare element reprezentînd un genom. În celulele terminale ale trichomului se află doar un singur element cromatinian care suferă replicația. Celulele cu mai multe elemente cromatinice sînt polienergide, deoarece fiecare element reprezintă un genom complet.

La Pleurocapsa fuliginosa (Chamaesiphonales), Beck a arătat că dintr-un spor care conține un singur element cromatic, prin germinație rezultă o celulă veziculară de 50 μm lățime, în ea aflîndu-se un număr mare de elemente cromatice identice. Ulterior, fiecare element cromatic devine înconjurat de o porțiune de material citoplasmatic și o membrană. Celula este transformată într-o masă de endospori care se eliberează prin ruperea membranei celulei mamă. Fiecare endospor va da naștere unui nou trichom prin germinare și diviziuni succesive.

Apariția mai multor elemente nucleare distincte în fiecare celulă este un indiciu al polienergiei cianoficeelor. În akineți (celule de repaus) se află un aparat cromatinian voluminos și spongios. El se divide apoi succesiv. La Chroococcales și Nostocales apar nannocite (celule foarte mici), care reprezintă celule ce rezultă din diviziuni succesive, neurmate de creșterea lor.

La microscopul electronic zonele cromatinice prezintă o structură omogenă caracterizată de prezența unor fibre foarte fine de ADN dispuse într-un aranjament aparent neregulat. Lipsa membranei nucleare face însă să nu se diferențieze exact elementele cromatinice deoarece ele se pot uni pentru a forma ADN-plasmă coerentă. ADN-ul cianoficeelor nu este asociat cu histonele, fapt dovedit de cercetări histochimice.

Rezultă că nucleoizii bacterieni și cromatinozomii cianoficeelor sînt structuri similare și de aici reiese și marea asemănare a acestor două grupe de organisme procariote. Nucleoizii și cromatinozomii nu sînt înconjurați de membrane care să-i separe de citoplasmă. Ele se pot amesteca dînd o rețea sau o masă nediferențiată numită ADN-plasmă. În aceste formațiuni ce reprezintă genoforul, ADN-ul, nu este asociat cu proteinele bazice. La microscopul electronic, moleculele de ADN din ADN-plasmă apar ca fibrile preferențial orientate paralel cu axa lungă a celulei. La bacterii, atașarea de membrană, la formele unde coexistă nucleoizii și episomii, este esențială pentru distribuirea genoamelor acestora în celulele fiice.

La cianoficee se vorbește, în ultimul timp, de existența unui model asemănător aceluia întîlnit la bacterii de atașare a elementelor genetice de membrana celulară. Elementele cromatice sînt separate de pereți longitudinali, ce derivă din membrana citoplasmatică, ca septuri ce se ating la centrul celulei, închizîndu-se după modelul diafragmatic.

La cianoficeele polienergide, filamentoase, elementele cromatice se replică și se distribuie în celulele fiice în număr egal sau aproape egal. Aranjamentul paralel al elementelor cromatice la cianoficee se aseamănă cu modelele nucleare de la unele organisme mezo sau eucariote ce au un număr mare de cromozomi, orientați paralel unii față de alții segregînd prin alunecarea unora peste ceilalți perpendicular pe planul de diviziune fără a apare fusul de diviziune, așa cum se remarcă la Heliozoare, Amoeba sp., Euglena sp., Peridinium tabulatum etc. Cromozomii acestor grupe de organisme se aseamănă cu elementele cromatice de la cianoficee prin persistența lor pe parcursul întregului ciclu celular. La cianoficeele cu mai multe elemente cromatinozomice (forme hiperploide) ca și la alte organisme, ca Aulacantha scolymantha și alte protozoare, nivelul înalt poliploid al unora din aceste organisme nu necesită distribuția perfect egală a numărului de cromozomi în celulele fiice,

repartizarea neechilibrată a acestora, datorită redundanţei materialului genetic, neafectînd funcţiile vitale ale acestora. Această situaţie este determinată de faptul că genele, la organismele procariote, fac parte dintr-un singur grup de linkaj, fiind strîns înlănţuite. Prezenţa mai multor genofori nu înseamnă prezenţa unui număr suplimentar de gene ci mai curînd faptul că acelaşi grup de gene (acelaşi grup de linkaj) este prezent prin mai multe copii.

C. PROBLEMA TRECERII DE LA STRUCTURA PROCARIOTĂ LA STRUCTURA EUCARIOTĂ

Rezolvarea problemei trecerii de la organizarea procariotă la aceea eucariotă, ar înlătura cea mai mare discontinuitate evolutivă care există în lumea vie. În acest domeniu au apărut multe ipoteze, unele destul de promiţătoare, dar datele experimentale sînt încă insuficiente pentru a se ajunge la o oarecare certitudine. Mai mult, ipoteza originii endosimbiotice a celulei eucariote nu atacă frontal esenţa trecerii de la organizarea genetică procariotă la aceea eucariotă. Deoarece unele caractere morfo-biochimice ale mitocondriilor, dar mai ales ale cloroplastelor, prezintă asemănări cu acelea ale celulelor procariote de bacterii şi alge albastre, s-a emis ipoteza originii endosimbiotice a acestor organite celulare din celule procariote. Dar toate schemele evolutive propuse evită problema localizării exacte a trecerii de la condiţia procariotă la condiţia eucariotă şi mai ales a trecerii de la organizarea genetică procariotă la aceea eucariotă.

Ipoteza originii endosimbiotice a celulelor eucariote admite că mitocondriile, cloroplastele şi eventual alte organite celulare derivă din procariote ancestrale libere, celula eucariotă fiind rezultatul unui lanţ de endosimbioze specifice, celulele procariote apărînd înaintea tuturor formelor actuale celulare eucariote. Această ipoteză este susţinută de biologi precum Sagan şi Margulis.

Se admite că prin mutaţia unei gene, o structură neesenţială poate fi pierdută, dar că achiziţionarea unei noi structuri este rezultatul mai multor mutaţii şi se realizează într-o perioadă lungă de timp. Ipoteza originii endosimbiotice admite că în populaţia

iniţială de celule procariote, selecţia a acţionat în două sensuri: pe de o parte a dus la stabilizarea celulelor fotosintetizatoare (ce formau ATP prin fosforilare) iar pe de alta la stabilizarea celulelor care foloseau porfirinele în oxidarea carbohidraţilor, adică a celulelor cu respiraţie anaerobă. Din procariotele fotosintetizatoare, care respirau aerob chiar în lipsa luminii, folosind pigmenţii porfirinici au derivat algele albastre (cyanophyceae) capabile de fotosinteză şi de producerea ATP prin respiraţie, dar alături de ele existau şi celule aerobe, incapabile de fotosinteză.

Prima fază în evoluţia celulei eucariote este considerată etapa ingerării celulei procariote aerobe (ce reprezintă o protomitocondrie) în citoplasma unei celule anaerobe heterotrofe. Această simbioză, ducînd la formarea de materie organică cu ajutorul ATP, produs pe cale oxidativă, a devenit obligatorie.

Apoi, algele albastre, procariote, printr-o endosimbioză asemănătoare au devenit „protoplastide" sau „proplastide", această endosimbioză ducînd la formarea celulelor eucariote fotosintetizatoare în regnul vegetal. Se apreciază că, încă de acum circa un miliard şi jumătate de ani, fotosinteza a condiţionat direct sau indirect întreaga viaţă terestră prin producerea de oxigen pe cale biogenă.

Serra (1968) apreciază că organitele citoplasmatice de proveniență endosimbiotică, autonome din punct de vedere genetic, sînt de fapt cele mai active sisteme energetice pentru schimburile respiratorii şi fotosinteză, aceasta fiind un argument pentru ipoteza originii lor endosimbiotice. Mai mult, cercetările lui B. Ephrussi cu mutantele „petite" de drojdii (lipsite de citocromoxidază, de citocromii a, a_3, b şi c din mitocondrii) au evidenţiat transmiterea acestora după legile eredităţii extracromozomale (nemendelian deci), pentru ca, ulterior, să se evidenţieze prezenţa ADN-ului şi a unui sistem de sinteză proteică la nivelul mitocondriilor, ceea ce denotă faptul că, iniţial, aceste organite au existat ca enităţi libere, independente. Acest ADN mitocondrial, după cercetările lui M. Nass şi S. Nass, este asemănător celui bacterian, fiind alcătuit din macromolecule ciclice, asemănătoare de asemenea acelora găsite în plasmidele şi epizomii din citoplasma unor bacterii. Aceeaşi structură ciclică este caracteristică şi macromoleculelor ADN-ului plastidial, dar acestea sînt mult mai lungi decît cele ale ADN-ului mitocondrial. O altă particularitate comună ADN-ului mitocondrial şi ADN-ului plastidial este neasocierea cu proteinele bazice de tip histonă ca şi posedarea unor mecanisme de replicare independentă. După cum am văzut aceasta este o caracteristică esenţială şi pentru ADN-ul nucleoidului bacterian sau cromatinozomului cianoficeean.

Dacă după endosimbioza unei bacterii, ce a devenit mitocondrie, apoi a unei alge albastre, ce a devenit plastidă, a avut loc, în sfîrșit, endosimbioza unui spirochet flagelat, ne putem imagina că a avut loc, prin asemenea endosimbioze succesive, nașterea unei celule de tip eucariot în care există un aparat nuclear, un sistem mitocondrial prevăzut cu ADN și sistem de sinteză proteică proprie, inclusiv sistem de transport de aminoacizi (ARN—t), un sistem plastidial prevăzut de asemenea cu un ADN propriu, cu un sistem de sinteză proteică și ribozomi (independente de cele celulare generale) și un aparat mitotic cu centrioli. A apărut astfel un sistem biologic superior organizat, capabil de fotosinteză și de diviziune celulară mitotică, ce caracterizează organizarea eucariotă, în cadrul căreia a fost posibilă o repartizare echilibrată a produșilor de replicație în celulele fiice.

Structurile flagelare, bazate pe modelul 9+2 (nouă perechi de fibrile periferice dispuse circular după generatoarea unui cilindru și două fibrile centrale), au stat la baza genezei aparatului mitotic la eucariote și, în urma unor eventuale mutații, au putut deveni centromerul entităților cromatice ale celulei gazdă, derivînd astfel tipul obișnuit de cromozom cu centromer. Relația dintre centromer și fibrele aparatului mitotic vine să sprijine ipoteza derivării centromerului și a aparatului mitotic pe o asemenea cale. De asemenea, legătura dintre nucleu și corpii bazali ai flagelilor prin așa-numitul blefaroplast, la unele flagelate, ca și prezența fusului de diviziune intranuclear la unele alge și ciuperci denotă legăturile arhaice dintre cromatina celulei gazdă și endosimbionții de tip flagelat din care a derivat prin complicate procese de mutageneză, aparatul mitotic. Prin prisma acestei ipoteze a originii endosimbiotice a celulei eucariote, aceasta poate fi considerată un sistem multigenomic, în care, alături de genomul nuclear, coexistă cel mitocondrial, plastidial și al granulilor bazali flagelari. Elementele cu origine endosimbiotică, fiind la origine o celulă liberă, sînt capabile să desfășoare în cadrul celulei gazdă funcția autoheterocatalitică a propriului ADN, nepierzîndu-și niciodată capacitatea autoreplicării ADN-ului propriu, ceea ce, în cazul mitocondriilor, dar mai ales al cloroplastelor, a fost bine evidențiat.

Dar, după cum se poate vedea, ipoteza originii endosimbiotice a celulei eucariote nu rezolvă problema esențială: trecerea de la organizarea genetică procariotă (neasocierea ADN-ului cu histonele, persistența corpilor cromatinici pe parcursul întregului ciclu de viață și posibila sinteză continuă de ADN între două diviziuni succesive, lipsa membranei nucleare) la organizarea genetică eucariotă

(prezența unui număr mare de cromozomi — structuri caracteristice ce apar doar în timpul mitozei la formele tipice eucariote —, asocierea ADN-ului cu proteinele bazice la nivelul cromozomilor, prezența unei membrane nucleare ce separă cromozomii de citoplasmă). Această problemă ar putea fi în parte elucidată prin studii aprofundate asupra organizării materialului genetic la bacterii, alge albastre și organisme eucariote de tip primitiv.

Cercetările noastre (L. Gavrilă, 1973) asupra organizării materialului genetic la algele albastre procariote au evidențiat deosebiri mari între ordinul Chroococcales și Nostocales, pe de o parte, și ordinul Oscilatoriales pe de alta (Fig. 64) și ne-au permis să apreciem că primele două ordine de Cyanophyceae sînt mai apropiate ca organizare de eucariote pe cînd ordinul Oscillatoriales este mai apropiat de bacterii prin prezența unui cromatinom unic. Punîndu-se întrebarea care este structura primară la aceste alge procariote și care este structura genetică derivată: aceea în care cromatinomul este alcătuit din cromatinozomi independenți, așa cum am întîlnit la Chroococcales și Nostocales, sau aceea întîlnită la reprezentații ordinului Oscillatoriales, în care cromatinozomii se află asociați la nivelul unei structuri de forma unei benzi — un cromatinom moniliform, răspunsul apare a fi mai degrabă ambiguu. Ar fi fost posibil ca o structură genetică compactă să fi dat prin dispersia elementelor sale un cromatinom cu cromatinozomi independenți, separați, cum este acela pe care l-am întîlnit la reprezentanții ordinelor Chroococcales și Nostocales, și atunci structura genetică a cromatinomului de la Oscillatoriales este o structură primară. Dar nu poate fi exclusă aprioric nici alternativa: o structură inițial dispersată a cromatinomului în cromatinozomi să fi dat, prin asociere treptată, o structură condensată și atunci structura cromatinomului de la Oscillatoriales este derivată.

Un argument citologic pentru prima supoziție este adus de organizarea cromatinomului la Phormidium autumnale (Fig. 64, d) ce face parte din ordinul Oscillatoriales, dar la care se remarcă tendința clară a dispersării cromatinomului în cromatinozomi independenți.

Structura eucariotă ar fi putut lua naștere printr-o reasociere a cromatinozomilor separați la nivelul unui nucleu delimitat de o membrană nucleară și în care, în timpul diviziunii, apar cromozomi, ca elemente cu independență relativă. Trecerea spre organizarea eucariotă s-ar fi putut realiza prin stadii intermediare reprezentate de structura mezocariotă de la Dinophyceae în care cromozomii, în număr mare, își păstrează, întocmai ca și cromatinozomii, indi-

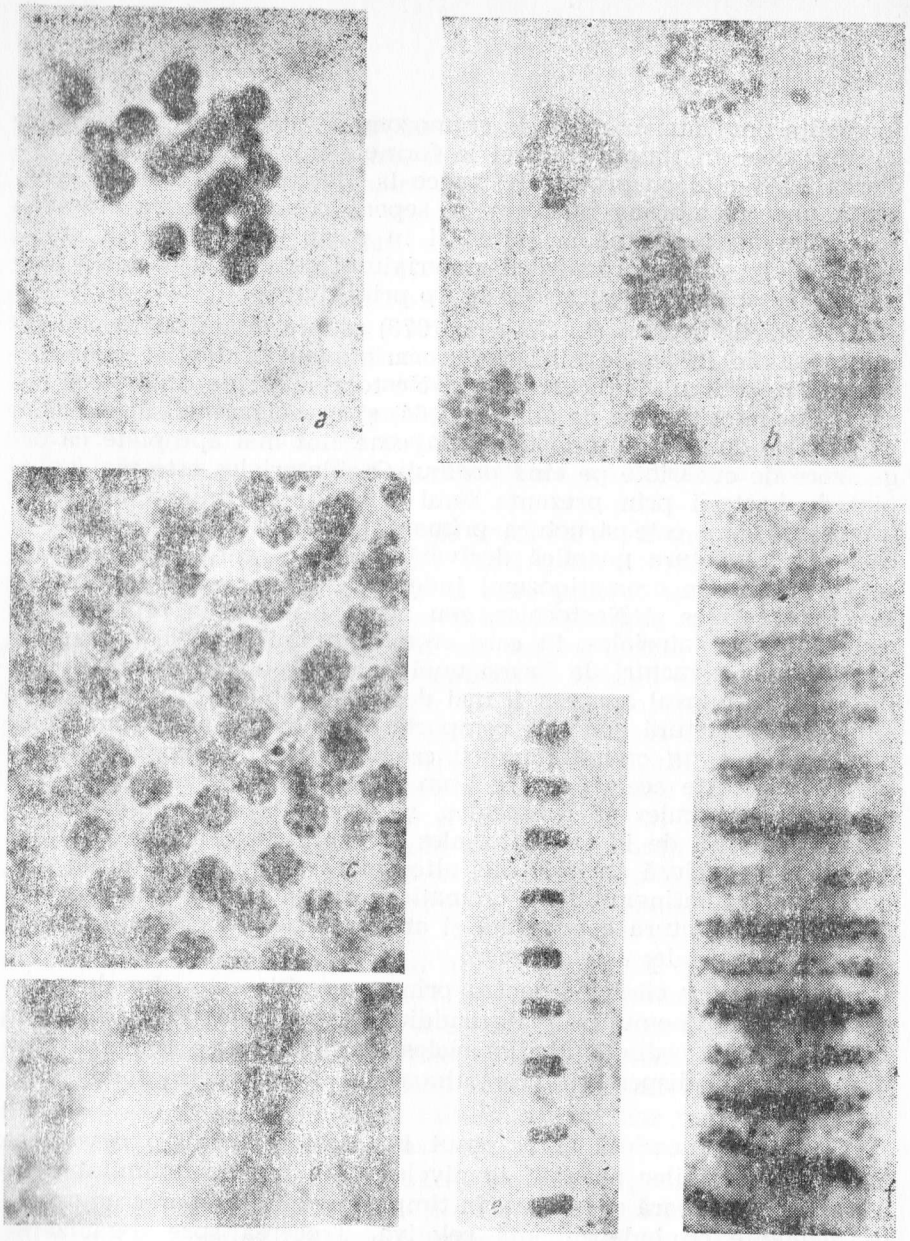


Fig. 64 — *Organizarea cromatinomului la algele albastre (original)* *a—b* — Chroococcales; *c* — Nostocales; *d—h* — Oscillatoriales: *a* — Gloeocapsa minuta *f.* typica; *b* — Gloeocapsa turgida: *c* — Anabaena contorta; *d* — Phormidium autumnale; *e* — Oscillatoria irrigua; *f* — Lyngbya spirulinoides;

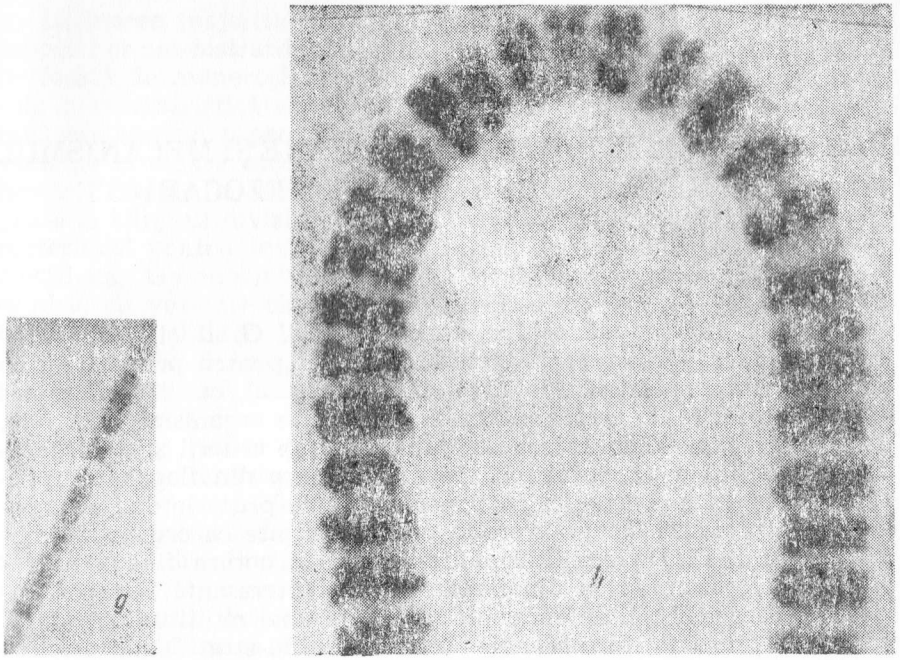


Fig. 64 — *g* — Oscillatoria amphibia, *h* — Oscillatoria tenuis;

vidualitatea pe tot parcursul ciclului celular, inclusiv interfază. O asemenea situaţie este întîlnită şi la Euglenophyceae, cu organizare tipic eucariotă. Eucariotele şi procariotele prezintă mai multe asemănări decît deosebiri în cinetica activităţii materialului genetic la nivelul molecular. Marile deosebiri apar însă la nivel supramolecular, cromatinozomal şi cromozomal.

Capitolul VII

PARTICULARITĂȚILE DE ORGANIZARE ȘI MECANISMUL DIVIZIUNII LA ORGANISMELE MEZOCARIOTE

În anul 1957, două echipe de cercetători, Grell și Wohlfarth-Bottermann și Grassé și Dragesco, au arătat pentru prima dată că nucleele dinoflagelatelor, la nivel ultrastructural, ca și cromozomii lor, sînt diferite de acelea ale celor mai multe organisme eucariote. În același timp ele se deosebesc, după anumite criterii și de organizarea genetică a procariotelor. Cu alte cuvinte dinoflagelatele prezintă o organizare genetică intermediară între procariote și eucariote, din care cauză Dodge a propus să fie definite ca organisme mezocariote (J. D. Dodge, 1971). Într-adevăr, structura fină a nucleului și cromozomilor la dinoficee relevă o interesantă intrepătrundere de caracteristici de eucariote (prezența unei multitudini de cromozomi, prezența membranei nucleare dublu-stratificată electronoptic și prezența unei diviziuni mitotice, e drept atipice, în care se remarcă modificări spectaculoase în evoluția cromozomilor) și de procariote (lipsa proteinelor bazice din nucleu, ADN-ul la majoritatea speciilor nefiind asociat cu histonele, alcătuirea cromozomilor din fibrile fine, asemănător nucleoidului bacterian sau cromatinozomului cianoficeean și posibila sinteză continuă din ADN pe parcursul întregului ciclu celular). De remarcat că și alte organisme unicelulare prezintă nucleu, în care se îmbină caracteristici de procariote și eucariote, cum ar fi bunăoară Heliozoarele și Radiolarii.

Nucleul dinoflagelatelor conține cromozomi al căror număr, aspect și formă variază de la specie la specie. Marginea cromozomilor poate fi neregulată precum la Oxyrrhis, sau regulată precum la Peridinium tabulatum (L. Gavrilă, 1972). La marea majoritate a dinoflagelatelor, cromozomii pot fi observați ca structuri discrete în toate stadiile ciclului celular, inclusiv în interfază (o caracteristică specifică acestui grup de microorganisme). Numai la Noctiluca sp., un dinoflagelat apoclorotic, mare, cromozomii nu sînt condensați în timpul fazei vegetative principale.

La marea majoritate a dinoflagelatelor, membrana nucleară are aspect normal-bistratificat — înconjurînd spațiul perinuclear, fiind perforată de numeroși pori nucleari. Aranjamentul porilor nucleari este o caracteristică de specie. Numai la Noctiluca sp., membrana nucleară are un aspect particular, fiind alcătuită dintr-un strat de vezicule circulare asociate cu un înveliș bistratificat. După Soyer, aceste vezicule ar constitui rezerve de material membranar, folosite la sfîrșitul diviziunii. Deși prezintă cromozomi condensați, caracteristici pentru toate dinoflagelatele, cu excepția unei specii de Noctiluca, Gymnodinium fuscum prezintă o membrană nucleară atipică, cu vezicule circulare, asemănătoare cu aceea de la nucleul de Noctiluca (Dodge, 1971).

Între 1960 și 1964, Giesbrecht și Kellenberger au studiat comparativ materialul genetic la bacterii și dinoflagelate și au desprins din cercetările lor asemănarea în structura fină a materialului genetic de la aceste grupe de organisme. Tot în aceeași perioadă Ris și Dodge dovedesc neasocierea ADN-ului cu proteinele histonice la acest grup, fapt confirmat prin degradarea enzimatică cu dezoxiribonuclează. În consecință cromozomii dinoflagelatelor constau numai din fibrile de ADN. Cercetările lui Grassé au arătat că fiecare fibrilă de ADN reprezintă un omolog al cromonemei normale multifibrilare. Fiecare fibrilă are formă de helix. La Noctiluca și Blastodinium, s-au descris regiuni pe cromozom care nu constau din ADN și care sînt interpretate ca axe ale cromozomului. Dar aceste aspecte reprezintă excepții deoarece toate celelalte dinoflagelate nu prezintă asemenea axe. Folosind-se modele matematice, s-a ajuns la concluzia că fiecare cromozom constă dintr-o grupare de discuri în care sînt aranjate transversal fibrilele de ADN, față de axa cromozomului. Fibrilele se întretaie de la un disc la altul.

După Dodge, clivarea cromozomului începe la un capăt și continuă spre celălalt capăt, separîndu-se cromatidele-fiice. În secțiune, cromozomii pot avea formă de Y, V și de perechi de cromatide (după cît de înaintat este procesul de clivare). Cromatidele stau paralel cînd cromozomii sînt scurți sau se încolăcesc reciproc cînd aceștia sînt lungi. Dodge a echivalat momentul clivajului cu profaza, timp în care are loc și duplicarea corpilor bazali ai flagelilor.

Diviziunea nucleară la dinoficee urmează după duplicarea cromozomilor și reprezintă o formă unică de mitoză endonucleară (Fig. 65). Odată cu clivarea cromozomilor are loc mărirea volumului nuclear, iar nucleul ia aspect trapezoidal în vedere ecuatorială. S-au evidențiat invaginații ale membranei nucleare care pătrund spre interiorul nucleului, iar uneori se întrepătrund sau se ating.

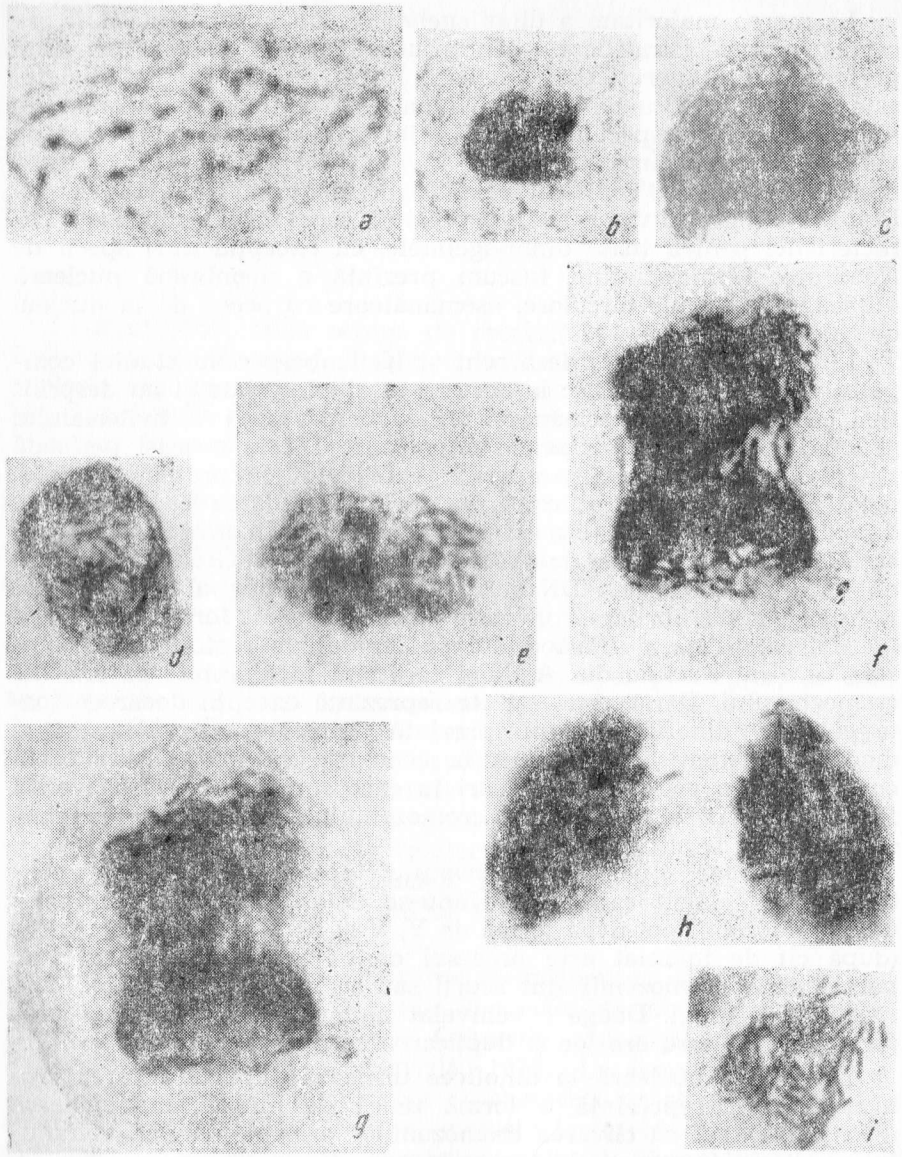


Fig. 65 — *Diviziunea nucleară la Peridinium tabulatum* (original) *a* — interfază, *b* — profază incipientă, *c, d* — profază avansată, *e* — metafază; *f, g* — anafază, *h* — telofază, *i* — metafază squash.

Asemenea invaginări ale membranei nucleare conţin 20—40 microtubuli, ribozomi şi ocazional mitocondrii şi granule de amidon. În această fază a nucleului se poate vorbi de condiţia metafazică. Are loc alungirea polară a nucleului şi începe segregarea cromozomilor în direcţie diametral opusă. Concomitent are loc o constricţie mediană a nucleului. În acest timp, aşa cum s-a evidenţiat la Woloszynskia micra, jumătatea inferioară a celulei (hipoconul) clivează şi apar două perechi de flageli. Extensia nucleului continuă, acesta luînd formă de halteră. Se separă în final doi nuclei fii.

Se admite că legăturile dintre cromozomi şi membrana nucleară ar contribui la segregarea cromozomilor în doi nuclei fii, dat fiind faptul că asemenea legături au fost evidenţiate în timpul diviziunii. Prin extensia nucleului, cromozomii sînt îndepărtaţi spre poli opuşi. Se consideră că şi tubulii din invaginaţiile membranei nucleare joacă un anumit rol în orientarea şi separarea cromozomilor fii în direcţii opuse.

La dinoflagelate a fost evidenţiat şi un nucleol în nucleu. Nucleolul poate fi ocazional străbătut de un cromozom care probabil, după părerea lui Rae, acţionează ca organizator nucleolar (Dodge, 1971).

Nucleolul nu dispare în timpul diviziunii nucleare. La Crypthecodinium cohnii, ca şi la eucariote, nucleolul constă din două părţi principale, o zonă fibrilară inelară şi un component periferial granular. Granulele sînt dizolvate cu ribonuclează, arătînd că sînt reprezentate de ARN. În experienţe cu uridină tritiată s-a dovedit că atît nucleoul cît şi matrixul intercromozomal sînt implicate în sinteza ARN-ului. Există, pe fondul comun al comportamentului nucleului în diviziune la dinoficee, şi unele particularităţi specifice anumitor grupe de dinoflagelate sau chiar anumitor specii.

La Prorocentrum micans, cromozomii interfazici sînt condensaţi şi clar vizibili în nucleu din care cauză începutul diviziunii este considerat momentul în care cromozomii apar pentru prima dată ca filamente duble (fig. 65 c). Cromatidele perechi sînt înfăşurate între ele şi formează 3 sau 4 ture de răsucire care duc la păstrarea împreunată a cromatidelor surori, deoarece nu există centromeri care să le unească. În metafază, cromatidele surori stau mai mult sau mai puţin paralele una faţă de cealaltă de-a lungul ecuatorului. Uneori, datorită spaţiului nuclear mic, capetele cromatidelor se pot curba. Cromatidele surori se deplasează spre poli opuşi. Deplasarea cromatidelor poate fi asincronă, unele rămînînd încrucişate la ecuatorul nucleului mult timp după ce majoritatea cromatidelor surori s-au separat şi grupat la poli opuşi. În telofază cromozomii nu-şi pierd condensarea aşa încît diviziunea se poate termina cu cromo-

zomii intacți și vizibili chiar în interfază. Și acesta este un comportament care amintește pe acela al nucleoidului sau cromatinozomului procariotelor. În diviziunea nucleară la Prorocentrum micans nu apare fus de diviziune, iar ca urmare cromozomii nu posedă centromeri. Experiențe cu inhibitori mitotici, de tip colchicină, 8-hidroxichinoleină, acenaftenul, α-mercapto-etanolul au demonstrat lipsa unui fus de diviziune în accepțiune clasică, deoarece nu se înregistrează inhibiția mitozei și nici acumulare de metafaze. De asemenea, experiențe de iradiere cu raze X, efectuate de către Dodge și Godward, au demonstrat absența centromerului de tip normal, întrucît fragmentele de cromozomi, ce rezultă în urma iradierii, sînt capabile să migreze în afară fără a forma micronuclei.

La Gyrodinium fuscum, datorită lungimii excepționale a cromozomilor, înfășurarea cromatidelor surori este remarcabilă. Speciile cu cromozomi scurți, cum ar fi cele ale genului Gymnodinium, prezintă o singură răsucire a cromatidelor sau cel mult două, iar uneori pot apare cromatide separate.

Separarea anafazică la majoritatea speciilor se desfășoară după modelul aceleia de la Prorocentrum, adică cu alunecarea spre poli opuși a cromatidelor surori. La unele specii s-a pus în evidență în anafază un nucleol care se divide în două, așa cum se întîmplă la Oxyrrhis marina, Gyrodinium cohnii și Gonyaulax tamarensis.

Urmare a unui proces sexuat, realizat prin copularea anizogameților, are loc și diviziunea meiotică. Cei doi nuclei ai anizogameților — unul mai mare, altul mai mic — își amestecă cromozomii aflați în stare contractată și distinct colorați. După fuziune, cromozomii se decontractă și devin relativ nedistincți, în această stare aflîndu-se și în chistul rezultat din copularea anizogameților. Cînd începe meioza, cromozomii se contractă din nou, se condensează și apar a fi mai mult sau mai puțin împerecheați. În desfășurarea meiozei s-a descris un stadiu, numit „Knäuelstadium", care a fost considerat drept un stadiu post-zigotenic, dar care se aseamănă cu o profază a mitozei la speciile cu cromozomi lungi, nucleul fiind însă mult mai voluminos decît cel mitotic. În anafaza I, cromozomii se separă prin clivaj longitudinal în 2 nuclei. În aceștia urmează a doua diviziune meiotică.

Referitor la structura cromozomului, la microscopul optic s-a evidențiat că acesta constă din cromoneme spirale, prezentînd în medie 5—8 giri. În urma iradierii cu raze X, la 4000 r, se produc modificări structurale la nivelul acestor cromozomi, exteriorizate prin apariția punților anafazice, reprezentate de unul sau mai mulți cromozomi. La nivelul cromozomilor, în afară de ADN nu s-a putut evidenția ARN, lipide și, după cum am amintit, proteine bazice.

Cantitatea de ADN pe cromozom este remarcabilă. Perioada sintezei ADN-ului la dinoflagelate este deosebită de aceea de la organismele eucariote la care este plasată cu cîteva ore înainte de debutul diviziunii. Ca și la bacterii și algele albastre, la dinoflagelatul Prorocentrum, sinteza ADN-ului este potențial continuă, pe parcursul întregului ciclu celular, în condiții nerestrictive.

La microscopul electronic, după cum am văzut, s-a demonstrat natura fibrilară esențială a cromozomilor de dinoflagelate. În timpul diviziunii, fibrilele fii se separă în cromatidele surori multifibrilare. Această separare este posibilă datorită aranjamentului plectonemic al perechilor de fibrile.

Cercetările noastre de citogenetică, desfășurate la multe populații de Peridinium tabulatum, au evidențiat mecanismul diviziunii și organizarea materialului genetic la această specie de apă dulce (L. Gavrilă, 1972). Nucleul interfazic apare sub forma unui corp globulos, dimensiunea sa fiind variabilă, ceea ce sugerează fie un grad diferit de ploidie pe care-l prezintă diferiți indivizi din populațiile de Peridinium tabulatum, fie parcurgerea asincronă a sintezei ADN-ului de către aceștia. Cu intrarea în diviziune, nucleul își schimbă forma, luînd aspect reniform (Fig. 22). Cromozomii care sînt individualizați chiar în interfază, se prezintă în profază sub forma unor baghete cu distribuție randomizată în spațiul nuclear. Uneori în nucleu, printre cromozomi apare o masă cromatică care reprezintă nucleolul mare. Aranjamentele particulare sub formă de coif roman sînt caracteristice stadiilor de trecere de la profază la metafază, ale diviziunii. Numărul de cromozomi, variabil în diferiți nuclei, poate fi estimat în jur de 40.

Trecerea spre anafază este marcată de modificarea orientării cromozomilor și variația lungimii lor. Cromozomii prezintă un remarcabil paralelism între ei ca și cu axa lungă a nucleului (în timpul diviziunii nucleului iau formă cilindrică caracteristică Dimensiunea cromozomilor variază între 10 și 16 microni iar marginile lor sînt drepte.

Grupul dinoflagelatelor reprezintă prin sine o interesantă trecere de la organizarea procariotă la organizarea genetică eucariotă.

Capitolul VIII

ORGANIZAREA GENETICĂ EUCARIOTĂ

1. INTRODUCERE

Celula procariotă reprezintă un sinergon în care toate funcţiile metabolice sînt îndeplinite de către citoplasmă sau de către invaginările membranei citoplasmatice fără a se diferenţia organite în vederea îndeplinirii diferitelor funcţii celulare. În cadrul celulei eucariote se diferenţiază organite intracitoplasmatice precum mitocondriile, dictozomii, cu rol bine stabilit în îndeplinirea unei anumite funcţii metabolice. Pe de altă parte, celula tipic eucariotă prezintă o organizare nucleară superioară, în care materialul genetic este delimitat faţă de citoplasmă printr-o membrană nucleară dublă electronoptic iar cromozomii prezintă un ciclu tipic de spiralizare şi despiralizare.

Evoluţia diviziunii celulare de la bacterii la plante şi animale superioare s-a realizat prin dezvoltarea membranei nucleare, care a separat spaţial cromozomii de procesele metabolice generale şi prin apariţia şi evoluţia unui fus de diviziune compus din mulţi microtubuli orientaţi, care au un diametru de 240 Å, fus care intervine în diviziunea nucleului. Odată apărut fusul de diviziune, a avut loc ataşarea cromozomilor la microtubulii săi prin intemediul unor structuri speciale, numite centromeri (cinetochori). La nivelul nucleului a apărut un corpuscul dens, mare, bogat în ARN, cunoscut ca nucleol. În afara nucleului, concomitent cu aceste reorganizări ale sale, a avut loc evoluţia unui centriol cilindric de tip 9×3. Totodată apare un ciclu al condensării şi decondensării cromonemelor, asocierea ADN-ului cu proteinele bazice de tip histonă şi diferenţierea regiunilor cromozomale eucromatice şi heterocromatice, acestea din urmă păstrîndu-şi condensarea şi în interfază.

Apariţia membranei nucleare are loc la trecerea de la algele albastre la algele roşii şi ea a dus la închiderea cromozomilor (genoforilor) într-un „spaţiu genetic" distinctiv (Du Praw, 1970). În acest „spaţiu genetic" delimitat a fost posibilă evoluţia, în cadrul aceluiaşi nucleu, a cromozomilor multipli, neomologi.

Proteinele bazice-histonice controlează configuraţia ADN-ului cromozomal şi activitatea genică. Diferenţierea eucromatinei şi heterocromatinei apare la grupe evoluate de alge, precum Characeae şi Phaeophyceae, jucînd un rol esenţial în citodiferenţierea şi în apariţia diferitelor tipuri de celule la organismele multicelulare.

Cromozomii eucariotici sînt pachete de ADN asociat cu histone (polipeptide bazice bogate în lizină, moderat bogate în lizină sau bogate în arginină) şi cu alte proteine precum ARN-polimeraza, ADN-polimeraza, NAD-sintetaza, nucleosidtrifosfataza ca şi cu proteine acide.

Cromozomii eucariotici au un conţinut de ADN proporţional cu dimensiunile lor. ADN-ul eucariotelor cuprinde o clasă înalt repetitivă de nucleotide, o clasă moderat repetitivă şi o clasă nerepetitivă (cu secvenţe unice de nucleotide). ADN-ul înalt repetitiv este asociat heterocromatinei centromerice.

În afară de existenţa unui ADN cromozomal, nuclear, la eucariote s-a pus în evidenţă prezenţa unui ADN cu localizare citoplasmatică, la nivelul unor formaţiuni intracitoplasmatice, precum mitocondriile, cloroplastele şi granulii bazali (la organisme flagelate). Cromozomii extranucleari din mitocondrii, cloroplaste şi granulii bazali, se deosebesc de cromozomii nucleari ai aceleiaşi celule, conţinînd ADN pur, neasociat cu proteine bazice histonice, întocmai ca la cromozomii procariotelor şi mezocariotelor. Există şi din punct de vedere cantitativ egalitate între cromozomii extranucleari ai eucariotelor şi ADN-ul celular (din cromozomul circular) de la bacteria Escherichia coli.

Cromozomii mitocondriali (Fig. 66) se prezintă ca cercuri închise formate din dublu-helixuri de ADN, fiind asemănătoare cromozomului circular bacterian, replicîndu-se, ca şi acesta, după modelul semiconservativ, avînd enzime ADN-polimerazice proprii şi specifice.

La nivelul mitocondriilor se află de asemenea ribozomi mitocondriali specifici, mult mai mici decît cei citoplasmatici, ARN-t mitocondrial şi enzime ale sintezei proteice proprii.

Cromozomii cloroplastici se prezintă ca molecule liniare sau circulare de ADN, neasociat cu histonele.

Cantitatea de ADN cloroplastic depăşeşte pe aceea a ADN-ului mitocondrial. La nivelul cloroplastelor se află ribozomi de tip 60—66 S, mai mici deci decît cei citoplasmatici care au coeficientul de sedimentare de 70—76 S. Şi cloroplastele beneficiază de un sistem de sinteză proteică proprie, intracloroplastică, relativ independent faţă de cel citoplasmatic. În cadrul metabolismului celular, la eucariote, însă, se stabilesc complicate raporturi de interdependenţă între

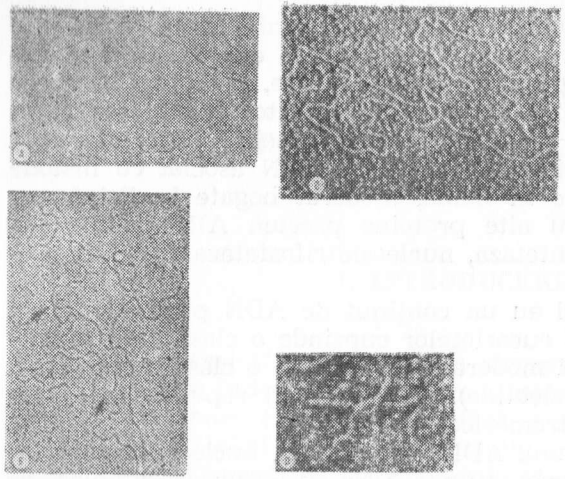


Fig. 66 — *Cromozomi citoplasmatici (extranucleari).* *A* — Un inel de ADN mitocondrial din fibroblaste de şoarece, măsurînd circa 5 μm, circumferinţă (×47.200), (după Nass, 1966). *B* — ADN-ul mitocondrial din ficatul de şobolan, presupus a fi în procesul de replicare, segmentele A şi B reprezintă segmente fii, fiecare avînd 1,8 μm lungime, pe cînd segmentul C este segmentul mamă de 33 μm lungime. Un segment fiu, împreună cu segmentul mamă, are 5,1 μm (×77.100, după Kirschner et al., 1968). *C* — Două inele împreunate (catenate) de ADN mitocondrial din celulele Hela (×39.000, după Hudson şi Vinograd, 1967). *D* — Detaliu din inelele interconectate de ADN reprezentînd localizarea legăturilor dintre molecule. (×72.500, după Hudson şi Vinograd 1967, din Du Praw, 1970)

genele cromozomilor nucleari şi genele cromozomilor extranucleari (Du Praw, 1970).

Cromozomii extranucleari sînt purtători ai genelor care transmit caracterele pe linie nucleară (ereditate citoplasmatică) formînd plasmotipul care, alături de genotip, alcătuiesc idiotipul.

Genomul eucariotelor constă din două feluri distincte de secvenţe în bazele ADN-ului, redundante (repetitive) şi unice, iar cel mai redundant ADN corespunde regiunilor heterocromatice. Se admite că zonele care prezintă un ADN repetitiv intervin cu predilecţie în procesele de reglare ale activităţii genice, celelalte regiuni reprezentînd gene structurale.

După Rice (1972) evoluţia organismelor eucariote a implicat un continuu proces de adiţie de secvenţe repetate de nucleotide la genomul lor.

Fibra nucleohistonică de bază a cromozomului eucariotelor conţine un singur dublu-helix de ADN supraspiralizat, ansamblarea componenţei proteice şi a ADN-ului la eucariote realizîndu-se la nivelul unor zone specifice ale membranei nucleare (annuli). Membrana nucleară este un loc de sinteză a ADN cel puţin în unele perioade ale fazei de sinteză din interfaza ciclului celular, ea oferind puncte de ancorare pentru capetele moleculelor liniare de ADN, împiedicînd răsucirea superspiralelor în fibrele cromozomale.

Pentru cromozomii care prezintă centromer, fragmentarea membranei nucleare în timpul diviziunii nucleare este o condiţie sine-qua-non în vederea stabilirii legăturii dintre cromozomi şi fibrele cromozomale ale fusului de diviziune — aparat mitotic elaborat în cursul evoluţiei eucariotelor în vederea repartizării echilibrate a cromozomilor spre poli. Repartizarea echilibrată a cromozomilor eucariotici spre poli este necesară deoarece ei sînt purtători de gene diferite. O repartizare neechilibrată a lor în nucleii fii ar duce la apariţia diferenţelor de ordin calitativ şi cantitativ în informaţia genetică a celulelor fiice, diferenţe care uneori sînt incompatibile cu viaţa celulelor, a organismelor. Acest lucru nu se întîmplă la procariote, la care fiecare genofor este purtătorul aceloraşi gene (aceluiaşi grup de linkaj iar repartizarea lor neechilibrată (în cazul că sînt mai mulţi în celulele polienergide) nu duce decît la apariţia diferenţelor de ordin cantitativ. La organismele eucariote primitive, la care cromozomii nu prezintă centromeri, fragmentarea membranei nucleare nu numai că nu este necesară dar este inoportună, ea asigurînd prin alungire, în lipsa unui fus de diviziune repartizarea materialului genetic în doi nuclei fii, separarea acestora făcîndu-se prin constricţia mediană a membranei nucleare, după mecanismul diafragmatic (euglenoficee). Celulele eucariote însă, evoluînd de sute de milioane de ani, pot prezenta mai mult decît o singură cale de a-şi replica materialul genetic şi a şi-l distribui în celulele fiice.

2. CICLUL CELULAR LA EUCARIOTE

a. *CICLUL MITOTIC*

La Procariote ca şi la mezocariote este posibilă o sinteză continuă de ADN, iar diviziunea genoforului poate să fie simultană cu sinteza materialului genetic, în condiţii de creştere foarte rapidă. La bacterii lipsesc fazele de repaus sintetic, aşa-numitele faze de gol sintetic (G_1 şi G_2). Nu acelaşi lucru se întîmplă la eucariote, cu unele excepţii (Amoeba proteus). Aici, oricît de prielnice ar fi condiţiile pentru diviziunea celulară, celula străbate un anumit ciclu, diviziunea celulară, în care se desfăşoară evenimentele distributive ale materialului genetic, fiind separată în timp de evenimentele reproductive, replicative, ale sale, care au loc în interfază (stadiul dintre două diviziuni succesive). Acest ciclu s-a numit ciclu mitotic, respectiv ciclu meiotic, dacă considerăm meiocitele. Structura com-

plexă, sofisticată a cromozomului eucariotelor impune un asemenea ciclu la care evenimentele reproductive sînt separate de cele distributive.

Ciclul mitotic al celulei eucariote este alcătuit din perioada metabolică (interfază) și perioada de diviziune. În cadrul ciclului mitotic se pornește de la o celulă cu o garnitură dublă de cromozomi, bunăoară celula diploidă, și se ajunge la nașterea a două celule identice cu cea inițială, deci cu aceeași garnitură dublă de cromozomi. Este deci un homociclu.

Ciclul meiotic este alcătuit tot dintr-un stadiu metabolic, interfazic, în care are loc replicarea materialului genetic al cromozomilor și un stadiu de diviziune în care, prin succesiunea a două diviziuni consecutive, se ajunge la nașterea uneia sau a patru celule, cu un număr de cromozomi redus la jumătate. Este deci un heterociclu.

La organismele diploide există un anumit raport între timpul minim al ciclului mitotic, volumul nucleului interfazic, și conținutul de ADN pe celulă.

Ciclul mitotic are o fază sintetică în interfază, care se desfășoară cu duplicarea componentelor esențiale ale celulei înainte de diviziune, și o fază de diviziune, în care se repartizează, în cele două celule fiice, produșii de replicare celulară. Faza de sinteză a ADN-ului este obligatoriu precedată de sinteza ARN și proteinelor numite de „inițiere" care modifică structura moleculară a cromozomilor creînd posibilitatea apariției punctelor de inițiere a replicației cromozomilor (respectiv a macromoleculelor de ADN). Sinteza de proteine poate continua pe parcursul întregii interfaze. Numai histonele au o sinteză ce decurge paralel cu aceea a ADN-ului, adică în faza „S".

Perioada de sinteză a ciclului mitotic este plasată la mijlocul interfazei, ocupînd o mică parte din aceasta, fapt dovedit prin cercetări autoradiografice și citofotometrice, prin care s-a urmărit variația cantității de ADN în interfază. În timpul perioadei S, fibrilele de cromatină cresc în diametru de la 0,1—0,15 μm la 0,3—0,5 μm.

Intervalul dintre sfîrșitul diviziunii, cînd cromozomii au o cantitate de ADN egală cu aceea din anafază și telofază, adică 2 C (două cromoneme) se notează cu G_1 (de la cuvîntul englez gap = gol) și se numește perioadă presintetică, intervalul ocupat de sinteza ADN-ului se numește faza S (de la Synthesis = sinteză), la sfîrșitul căreia cromozomii se află în faza de 4 cromoneme (4 C) deci cu cantitatea dublă de ADN, față de aceea inițială cu care au intrat în G_1, iar intervalul din interfază, plasat între sfîrșitul perioadei

de sinteză și debutul diviziunii, se notează cu G_2, căci în acest interval cantitatea de ADN, de 4C, pentru fiecare cromozom rămîne constantă, faza G_2 fiind numită și faza postsintetică (Fig. 67). În unele cazuri, precum în neuroblastele de Scuterelles și la debutul dezvoltării embrionare la amfibieni, sinteza ADN-ului se desfășoară pe tot parcursul interfazei. La celelalte organisme, de regulă, stadiul cel mai lung al interfazei este cel de sinteză.

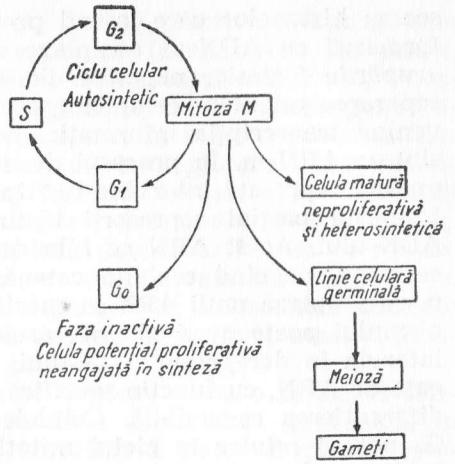


Fig. 67 — *Ciclul celular și componentele sistemelor celulare proliferative* (după Quastler, 1963, din B. John și K. R. Lewis 1969).

Mitoza reprezintă acea fază a ciclului celular în care se desfășoară procesele distributive, de repartizare a produșilor de replicare și la sfîrșitul căreia rezultă două celule fiice cu același set de cromozomi și aceeași cantitate de ADN pe care a avut-o celula mamă la începutul ciclului mitotic (2 C). Aceste celule fiice pot să evolueze în mai multe direcții. În primul rînd, celula postmitotică se poate matura și trece într-un stadiu de diferențiere. Resursele celulare sînt consumate în construirea echipamentului celulei specializate, încît acestea nu mai pot participa la construirea aparatului mitotic. Celulele acestea suferă modificări reversibile, intrînd temporar în faza de repaus G_0, cînd ele se pot divide numai sub influența unor factori externi sau ireversibile (devin enucleate nemaiputînd să se dividă) așa cum este cazul eritrocitelor mamiferelor.

Celulele diferențiate, care trec temporal într-o fază G_0, pot fi scoase din această fază de repaus dacă intervine un oarecare stimul extern. Așa este cazul celulelor hepatice (care în urma hepatoctomiei recapătă capacitatea de diviziune), al celulelor limfocitare (sub influența extractului din fasole — fitohemaglutinina) și al celulelor de rezistență (spori, ciști) care în condiții nefavorabile intră în faza G_0, din care ies, atunci cînd condițiile de viață revin la normal. În limfocite poate avea loc sinteza ATP, încorporarea aminoacizilor în proteinele nucleare și încorporarea multor precursori purinici și pirimidinici în ARN și ADN. Dar 80% din ADN-ul acestor nuclei ai limfocitelor se află în stare represată, fiind inactiv în sinteza ARN-m. Represia funcției de amorsă a ADN-ului este pusă pe

seama histonelor care, avînd proprietăţi de polielectroliţi cationici formează cu ADN-ul complexe electrostatice prin interacţiune cu grupările fosfatice negative ale ADN-ului polianionic şi împiedică separarea catenelor complementare ale dublului helix de ADN, prevenind transcripţia informaţiei genetice, pentru care este necesară sinteza ARN-m. În procesul de derepresie a sintezei ARN din cromatina represată intervine un tip special de ARN nuclear, care înlocuieşte parţial represorii histonici dintr-o anumită porţiune a ADN-ului. Acest ARN se hibridează cu una din catenele de ADN separate, pe cînd cealaltă catenă liberă poate servi drept matriţă pentru sinteza unui ARN-m specific (Fig. 68). Fiecare ţesut al organismului poate avea sau nu, asemenea tipuri specifice de ARN ce intervin în derepresia ADN-ului. Există o categorie de histone, legate de ARN, cu funcţie specifică în sinteza ARN-ului. Aceasta este diferenţierea reversibilă. Celulele care intră în stadiul de repaus G_0 pot să reintre în ciclul mitotic fie în G_1, atunci cînd trecerea în G_0 s-a făcut imediat după terminarea mitozei, fie direct în diviziune, atunci cînd trecerea în G_0 a fost făcută după ce în prealabil aceste celule au realizat sinteza (replicarea) ADN-ului. Celulele care au suferit o diferenţiere extremă, de regulă, nu se mai pot divide. Aşa este şi cazul neuronului, la care lipsa diviziunii este legată credem, şi de mecanismele de engramare, de necesitatea menţinerii integrităţii căilor pe care circulă legăturile temporale. Diferenţierea ireversibilă caracterizează, după cum am văzut, eritrocitele enucleate de la mamifere şi neuronii. Aceste celule extrem de specializate, de diferenţiate, nu mai pot reintra într-un ciclu mitotic, celulele enucleate avînd de regulă şi o durată scurtă de viaţă.

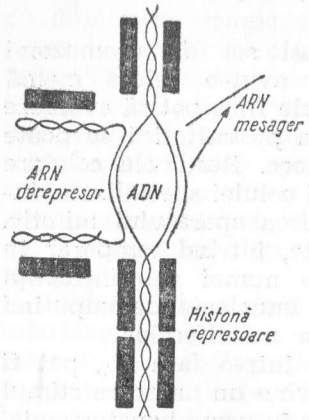


Fig. 68 — *Modelul derepresiei materialului genetic după Frenster.* După înlocuirea histonelor represoare de pe o catenă separată a dublului helix de ADN, ARN-ul specific, derepresor, se poate hibrida cu una din catenele de ADN eliberînd catena complementară de ADN de pe care ARN-m copiază informaţia genetică (din B. John şi K. R. Lewis, 1969).

Diferenţierea eritrocitelor depinde de stabilizarea complexului ARN informaţional în cele mai timpurii stadii ale liniei hematopoetice eritrocitare. După ce are loc stabilizarea acestui complex, are loc o scădere a sintezei de ARN. Cînd conţinutul de ARN este relativ scăzut, are loc o sinteză intensă de hemoglobină. Nucleul, în stadiile cele mai tinere ale dezvoltării liniei hematopoetice eritrocitare, serveşte pentru proliferare, după care devine inactiv mitotic şi este eliminat din celulă. Acest lucru se petrece la mamifere. La păsări, deşi eritrocitele sînt nucleate, nucleul eritrocitului matur este totuşi mic şi neimplicat în vreo sinteză legată de autoreplicaţia genomului. La batracieni, nucleul eritrocitelor este în stare condensată, datorită interacţiunii nucleohistonelor cu hemoglobina, căci hemoglobina se poate combina cu ioni fosfatici pentru a le neutraliza sarcinile negative. Cromatina condensată devine inactivă metabolic. Condensarea cromatinei în eritropoeză devine astfel un mecanism feed-back de nivel molecular, care modifică sinteza proteică pe măsură ce eritrocitul se apropie de maturitate. Eritrocitele nucleate de la amfibieni şi păsări au astfel un nucleu complet inactiv, incapabil de a sintetiza ADN, ARN şi proteină.

De asemenea, o altă cale pe care o poate urma o celulă la sfîrşitul diviziunii mitotice este aceea de a urma linia germinală, în care caz intră în ciclul meiotic constituind sistemul celular germinal.

Dar, în cele mai multe cazuri, mai ales în ţesuturile meristematice, embrionare, celula postmitotică poate să înceapă un nou ciclu mitotic trecînd în G_1.

Ţesuturile embrionare, meristematice, ţesuturile de regenerare, sistemul hematopoetic (splină, măduvă osoasă) şi anumite epitelii din intestin şi uter au o capacitate mare pentru diviziune şi putere de regenerare bună. Epiteliul ficatului şi epiteliul renal au o capacitate de mitoză reţinută dar potenţială şi putere de regenerare variabilă. Muşchii au o foarte scăzută capacitate pentru mitoză, respectiv o săracă putere de regenerare. Celulele nervoase au pierdut capacitatea pentru mitoză şi puterea lor de regenare este nulă.

La celulele poliploide poate să aibă loc, nemaifiind nevoie de o dublare a cantităţii de ADN, o trecere directă din G_0 în G_2, dar, în acest caz, în urma diviziunii vor rezulta celule diploide. Tot o trecere directă din G_0 în G_2 se remarcă la germinarea seminţelor, sau la nucleele celulelor embrionare, la care mitoza precede sinteza ADN-ului (B. John şi K. R. Lewis, 1969). Durata ciclului mitotic la organismele multicelulare este de 20—24 ore. Din această perioadă, fazele G_1 şi S ocupă 1/4 — 1/3 şi 1/2, restul timpului fiind ocupat de G_2 şi mitoză. Dar durata exactă a diferitelor faze ale ciclului mitotic este o caracteristică de specie şi de tip celular. Cea mai variabilă fază a ciclului mitotic este faza G_1. Mai constantă este faza S, care, la mamifere, pentru ţesuturile adulte, durează 7 ore. Uneori ea poate dura mai mult dacă ritmul de diviziune este mai scăzut. Faza S este mai lungă pentru liniile celulare care au o cantitate mai mare de ADN. Ca şi la mamifere, la plante durata fazei S, ca

dealtfel și durata ciclului celular, crește direct proporțional cu valoarea cantitativă a ADN-ului. Sînt și date, precum cele ale lui Da-Ping Young și E. O. Dodson (1970), după care la Avena strigosa forma autotetraploidă, cu o cantitate dublă de ADN nuclear, are aceeași durată a perioadei S ca și forma diploidă, pe cînd la Avena pilosa, cu conținut nuclear de ADN intermediar între forma 4 n și 2 n de Avena strigosa, are o perioadă S mai lungă. Structurile cromozomale sînt implicate în controlul temporal al sintezei ADN. În celulele din țesuturi cu proliferare rapidă, precum țesuturile tinere în culturi, neuroblastele de la embrion și meristemele radiculare de la plante, faza S tinde să ocupe în cea mai mare parte interfaza ciclului mitotic. În timpul segmentării ovulului fecundat, la Xenopus laevis, fazele G_1 și G_2 sînt excluse. Aceste faze reapar în perioada de blastulă tîrzie fiind foarte mari în faza de gastrulă timpurie.

Nu totdeauna duplicarea cromozomilor este urmată de diviziunea celulară și atunci se ajunge la fenomene de endopoliploidie și politenie.

Metodele autoradiografiei au evidențiat faptul că imediat după terminarea diviziunii, cromozomii sînt divizați longitudinal în două subunități (două cromoneme 2 C). În perioada S, fiecare subunitate, după o prealabilă separare, funcționînd ca o matriță își reface o pereche complementară din care cauză cromozomul din perioada S și pînă la sfîrșitul metafazei diviziunii este sub formă de (patru cromoneme 4 C). Prin separarea anafazică a cromozomilor fii se revine iar la starea 2 C, caracteristică cromozomilor la intrarea într-un nou ciclu mitotic.

Ciclul mitotic poate fi influențat de diferiți factori de mediu, în afară de particularitățile ce țin de natura speciei și tipul celular.

Temperatura mai scăzută lungește ciclul mitotic și poate chiar să blocheze diviziunea. Un efect similar are și temperatura ridicată.

S-a constatat că în activitatea mitotică la hamster există un ritm circadian marcant, avînd un maximum și un minimum. Durata sintezei ADN (T_s) și fazei G_2 este aproximată ca $\left(T_{G_2} + \frac{1}{2} M\right)$. T_s a fost de 8 h, iar $T_{G_2} + \frac{1}{2} M = 2$ h. După terminarea mitozei, celulele intră în faza G_0, neproliferativă din care sînt selectate randomizat pentru a se diferenția sau pentru a reintra în ciclul de regenerare.

b. *CICLUL MEIOTIC*

Ca și în ciclul mitotic, majoritatea evenimentelor importante ce determină meioza se desfășoară înainte de diviziunea meiotică și sînt de asemenea evenimente replicative prin care se sintetizează complexe macromoleculare în vederea reproducerii cromozomilor și structurării aparatului diviziunii. Aceste evenimente replicative se exteriorizează prin modificarea raportului nucleu-citoplasmă. În meiocite, nucleul, înainte de intrarea în diviziune, este mai mare decît cel al celulelor somatice înainte de a intra în mitoză. De asemenea, volumul nucleolului este semnificativ crescut la debutul meiozei.

ADN-ul este cel mai important component care stă la baza structurii și reproducerii cromozomilor. Sinteza ADN-ului în ciclu meiotic se desfășoară de asemenea în interfază, în perioada S sau chiar la începutul profazei meiotice. În majoritatea cazurilor, sinteza ADN-ului nu se termină în interfaza meiotică ci se continuă în profaza I. Astfel, s-a stabilit că, chiar în zigoten-pachiten, mai poate avea loc o sinteză suplimentară de ADN, reprezentînd 0,3 — 0,4% din ADN-ul cromozomal. Se consideră că sinteza suplimentară de ADN din profaza I meiotică, se leagă de mecanismul remanierilor prin crossing-over, de eventualele procese reparatorii ale acestora.

În zigoten se formează un ADN bogat în guanină-citozină, pe cînd în pachiten se sintetizează un ADN asemănător aceluia sintetizat premeiotic. ADN-ul profazic este indispensabil desfășurării meiozei. Blocarea sintezei acestui ADN împiedică formarea complexului sinaptinemal, complex care intervine în procesul de conjugare a cromozomilor omologi. Pentru îndepărtarea omologilor în diploten este nevoie de sinteza ADN-ului din zigoten, iar pentru separarea cromatidelor fii în anafaza a II-a este necesar un ADN sintetizat în pachiten. Dar cel mai important rol îl joacă sinteza ADN-ului din zigoten-pachiten în desfășurarea sinapsisului (conjugarea cromozomilor omologi) crossing-overului și formarea chiasmelor. Se admite că ADN-ul sintetizat în zigoten ar reprezenta sinteza întîrziată a unei anumite structuri axiale, bunăoară a centromerului cromozomilor, în timp ce ADN-ul sintetizat în pachiten ar fi legat de mecanismele reparatorii ale fragmentărilor prin crossing-over (schimb reciproc de fragmente între cromozomi omologi). Reproducerea cromozomilor în meioză se realizează, așadar, în interfaza tîrzie premeiotică, dar ea poate fi prelungită chiar și în profaza meiozei, fiind astfel de mai lungă durată decît reproducerea cromozomilor mitotici. Se acreditează părerea că reproducerea deplină a

cromozomilor meiotici are loc în stadiile de zigoten și pachiten, dînd astfel posibilitatea formării heteroduplexurilor de ADN și sintezei unor mici fragmente de ADN din cadrul remanierilor și reparațiilor, ce apar ca o consecință a crossing-overului. Rezultă de aici că, în ciclul meiotic, sinteza ADN-ului se poate realiza și atunci cînd cromozomul nu este în stare despiralizată (starea interfazică). S-a arătat că, la Tradescantia, sinteza ADN-ului continuă pînă în stadiul de leptoten, la Secale, pînă în zigoten iar la Trillium, sinteza ADN-ului continuă pînă în pachiten-diploten.

Sînt și alte date care arată că sinteza ADN-ului în ciclul meiotic se poate desfășura în diferite stadii ale profazei I. Interesant că apar și date contradictorii, chiar cînd se lucrează cu același obiect de studiu. Astfel, la șoarece sînt unele date după care sinteza ADN-ului, în ciclul meiotic are loc în interfază dar altele indică zigotenul-pachitenul drept stadiul de sinteză pentru ADN. Cu alte cuvinte este posibil ca meioza să înceapă fără o prealabilă sinteză a ADN-ului, fără replicarea cromozomilor.

De regulă replicarea premeiotică a ADN-ului cromozomilor de sex, heterocromatici, este întîrziată față de replicarea ADN-ului autozomilor.

La Lilium longiflorum s-a constatat că apar diferențe între compoziția ADN-ului sintetizat în interfaza meiotică și aceea a ADN-ului sintetizat în profaza meiotică, așa cum reiese din tabelul de mai jos (din John și Lewis, 1969).

TABELUL Nr. 3

Compoziția în baze azotate a ADN-ului sintetizat premeiotic din profaze I. meiotică.

Tipul de ADN	Compoziția în baze			
	C	G	T	A
ADN sintetizat premeiotic	20	22,8	30,2	27,0
ADN sintetizat în meioză	24,8	25,0	26,2	24,0

Formarea chiasmelor (puncte de contact dintre cromozomii omologi împerecheați) în meioză, la nivelul bivalenților, este condiționată de sinteza proteică și de formarea complexului sinaptinemal. De asemenea, sinteza ADN-ului este ea însăși dependentă de o sinteză simultană a anumitor proteine nucleare și combinarea sintezei proteice cu aceea a ADN-ului este esențială pentru formarea chiasmelor.

În timpul sintezei premeiotice a ADN-ului se sintetizează o histonă particulară care este absentă sau prezentă doar ca urme în

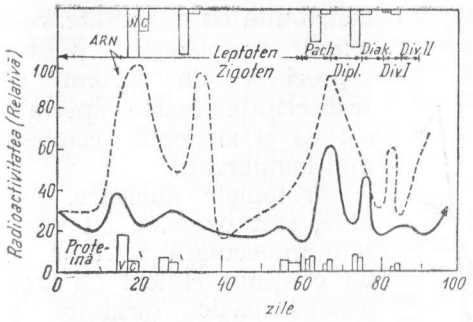


Fig. 69 — *Periodicitatea sintezei ARN și proteinelor în microsporocitele izolate de Trillium erectum.* Histograma reprezintă datele autoradiografice ale lui Taylor (1959) la microsporocitele de crin, grosimea barelor indică cantitatea de izotop încorporat. *N* = nucleu, *C* = citoplasmă (după Stern și Hotta, 1963, din B. John și K. R. Lewis, 1969).

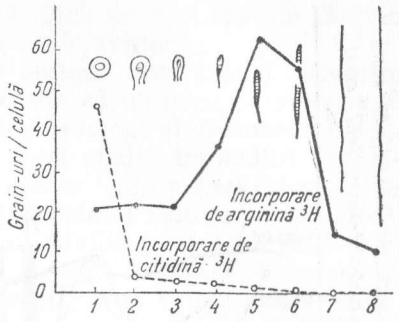


Fig. 70 — *Încorporarea CdR-H³ în ARN și a argininei H³ în proteină în timpul spermatogenezei la Chortophaga viridifasciata* (după Bloc. și Brack, 1964, din B. John și K. R. Lewis, 1969).

celulele mitotice. Această categorie de histone are un rol determinant în spiralizarea cromozomului.

În ciclul meiotic, sinteza proteinelor este sincronă cu sinteza ARN-ului (Fig. 69, 70). Blocarea sintezei ARN-ului în perioada pregătirii pentru diviziune meiotică duce la blocarea diviziunii. Dacă blocarea intervine în metafază-telofază, diviziunea nu mai poate fi blocată. Rezultă că, pentru desfășurarea normală a diviziunii este necesară sinteza unei anumite cantități de ARN în interfaza și profaza meiotică. Sinteza ARN-ului poate continua pînă în diakineză. După părerea lui Hotta și Stern sînt trei mecanisme de reglare a nivelului sintezei în celulele meiotice la Tulipa gesneriana: activitatea ARN-polimerazei, activitatea amorsei de ADN și surplusul de precursor, care determină activitatea kinazei (Fig. 71). ARN-polimeraza este asociată cromozomilor în tot timpul contracției și extensiei. Activitatea nucleosid-kinazei prezintă o variație paralelă cu aceea a sintezei ARN-ului. Sinteza ARN-ului are loc pe parcursul întregii profaze meiotice descrescînd însă semnificativ în timpul diachinezei. ARN-ul se asociază cu cromozomii în diakineză, dar este eliberat în citoplasmă cînd este dezorganizată membrana nucleară. O parte din ARN-ul sintetizat în meioză are caracteristici de ARN-mesager.

Dacă starea despiralizată a cromozomilor din interfază servește pentru transcripția informației genetice și replicare, starea condensată din meta-anafază conservă informația genetică pentru a fi

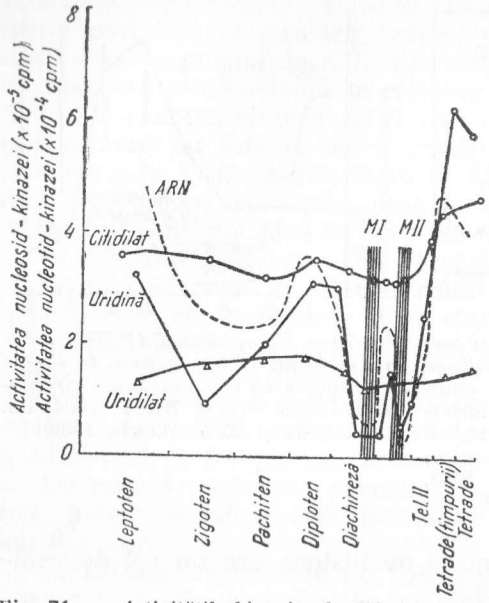


Fig. 71 — *Activităţile kinazice la diferite stadii ale ciclului meiotic la Tulipa gesneriana (după Hotta şi Stern,* 1965, din B. John şi K. R. Lewis, 1969).

distribuită cu exactitate. Sistemul cromozomal politen reprezintă un sistem de transcripţie foarte specializat ca şi sistemul cromozomal lampbrush.

Proteinele nucleare, histone, sînt proteine cu greutate moleculară mică şi cu un conţinut ridicat de aminoacizi bazici (arginină şi lizină). Funcţiile histonelor sînt deopotrivă structurale şi genetice. Ele contribuie la cimentarea moleculelor de ADN între ele, la spiralizarea şi despiralizarea macromoleculei de ADN, asigură stabilitatea macromoleculelor de ADN şi ARN, neutralizează sarcinile negative ale grupelor fosfatice ale ADN-ului sau altor macromolecule acide şi, în sfîrşit, pot forma scheletul cromozomului. Pe de altă parte histonele îndeplinesc şi funcţii genetice, printre care blocarea sau stimularea sintezei ADN-ului, represia funcţiei genei care controlează sinteza ARN, putînd funcţiona şi în calitate de ribonuclează. Tot histonelor li se atribuie influenţe în blocarea sau stimularea activităţii mitocondriei, în reglarea activităţii ATP-azei membranelor celulare şi schimbului ionic. Iată cît de însemnate sînt aceste proteine bazice pentru activitatea celulară în general dar mai ales pentru organizarea structurală şi funcţională a cromozomului. Prin complexarea ADN-ului cu o cantitate mai mare de histone, cromozomii devin mai spiralizaţi. Scăderea cantităţii de histone duce la despiralizarea cromozomilor. Spiralizarea maximă a cromozomilor este asigurată prin fracţia histonică bogată în lizină. Unele date indică acest rol pentru histonele bogate în arginină. Se pare că aceste neconcordanţe sînt rezultatul variabilităţii acestor proteine bazice în funcţie de ţesutul studiat. Rolul histonelor în ciclul spiralizării şi despiralizării este universal acceptat. O deosebită importanţă au histonele în reglarea activităţii genice. Sinteza histonelor poate fi iniţiată înainte de sinteza ADN-ului, dar sinteza lor continuă şi

în profaza meiotică, pînă în diakineză, ceea ce vorbeşte de la sine despre rolul lor complex, structural, genetic, reglator.

În zigoten-pachiten s-a evidenţiat sinteza unei fracţii histonice tipice acestui stadiu, despre care se crede că ar avea o importanţă specifică pentru cuplarea cromozomilor omologi şi formarea chiasmelor. Inhibarea sintezei proteice în acest stadiu împiedică organizarea complexului sinaptinemal, formarea chiasmelor, segregarea cromozomilor, citochineza şi formarea peretelui celular. Substanţele care inhibă sinteza acestor proteine pot inhiba şi sinteza ADN-ului dar nu şi pe aceea a ARN-ului, ceea ce indică faptul că asemenea proteine condiţionează iniţierea şi desfăşurarea sintezei ADN-ului. Aceste proteine sînt altele decît enzimele necesare sintezei ADN. În timpul meiozei, într-un anumit moment al interfazei premeiotice se sintetizează timidinkinaza, care face parte din categoria aşa-numitelor „proteine de diviziune".

Comings (1971) apreciază că proteinele alosterice au posibilitatea de a controla împerecherea cromozomilor. Ele au fost numite „proteine de împerechere" şi influenţează funcţia genetică a cromozomilor. „Proteinele de împerechere" au capacitatea de a se lega specific, strîns, de o anumită secvenţă de baze azotate de pe molecula de ADN, după care ele suferă modificări alosterice. Împerecherea proteinelor alosterice de la cei doi cromozomi omologi, prin suprafeţele lor complementare, condiţionează împerecherea cromozomilor omologi. După ce aceste proteine se leagă de molecula de ADN, este împiedicată orice altă asociere a acestei molecule cu alte proteine. Legarea de ADN este o caracteristică a proteinelor represoare. Prin procese de metilare, acetilare şi fosforilare, unele enzime au capacitatea de a inactiva histonele. Cînd represia nespecifică a histonelor este redusă, gena se poate exprima.

Condensarea heterocromatinei în interfază şi gradul de spiralizare a cromozomilor în mitoză sînt determinate tot de către asemenea proteine alosterice. Complexele proteice sînt dezorganizate la sfîrşitul ciclului meiotic, sintetizîndu-se noi proteine, reluîndu-se activitatea acestor proteine alosterice.

Nucleazele specifice, după unii autori, ar avea rolul de a condiţiona împerecherea cromozomilor omologi, menţinînd regiunile omoloage ale ADN-ului parţial neîmperecheate, împerecherea avînd loc prin formarea unor heteroduplexuri între catenele unice ale ADN-ului. În nucleohistone, numărul grupărilor bazice este egal cu numărul grupelor fosfatice din ADN. Raportul histone/ADN, prin legarea totală a grupelor acide din ADN de proteinele bazice, trebuie să fie egal cu 1,35 : 1. După acest raport se poate judeca gradul de represie a genomului. De exemplu, complexul ADN-his-

tonă, în raportul 1 : 1,5, nu este activ. Se admite că histonele inhibă sinteza ARN-ului la concentrații mici în lizină, pe cînd histonele bogate în arginină inhibă sinteza ADN-ului.

S-a constatat că sinteza experimentală a ARN-ului în nucleoli, realizată în absența proteinelor bazice, face ca acest ARN să se apropie prin compoziția sa de ADN, pe cînd acela produs în prezența histonelor, adăugate experimental, a avut o compoziție apropiată de aceea a ARN-ului ribozomal. Se trage concluzia că histonele nucleolare sînt implicate în reglarea activității ADN, ce servește ca matriță pentru sinteza ARN-ribozomal.

Sinteza histonelor se realizează după unii cercetători la nivelul nucleolului iar după alții la nivelul cromozomilor. Dar există o concordanță anumită în stabilirea perioadei de sinteză a ADN-ului și histonelor în faza S a interfazei premeiotice și în profaza I. Asincronia sintezei ADN-ului și histonelor este o particularitate a ciclului meiotic. În nucleii meiotici, spre deosebire de cei mitotici, se află histone cu o concentrație mai mică de lizină față de arginină.

Se poate ca, în unele cazuri, să apară un decalaj între perioada sintezei ADN-ului și histonelor, dar pînă în diploten, de regulă, sinteza histonelor poate fi completată.

La Acheta domesticus, s-a constatat că în leptoten-zigoten, nucleul conține 4 C ADN și numai 3 C histone. Neincluderea histonelor în cromozomi în timpul zigotenului facilitează conjugarea cromozomilor omologi. Prelungirea ciclului de spiralizare a cromozomilor în profaza I se poate explica prin cantitatea insuficientă de histone în nucleu. Spiralizarea maximă a cromozomilor se realizează în diachineză. La Lilium și Tulipa, în celulele meiotice se află histone care nu se găsesc în celulele somatice. Prezența acestor histone determină particularitățile structurale și funcționale ale cromozomilor în meioză. Modificarea intensității și perioadei de sinteză a compușilor macromoleculari de bază în meiocite apare drept cauză a trecerii acestor celule spre meioză.

Datele despre sinteza ADN-ului și histonelor în ciclul meiotic duc la concluzia că reproducerea cromozomilor poate avea loc, în acest caz, nu în interfază, ca în ciclul mitotic, ci în profaza I. Dacă în mitoză apare spiralizarea reciprocă între cromatidele surori, care dispare spre sfîrșitul profazei ca urmare a schimbării direcției de răsucire a cromatidelor, în meioză, spiralizarea relativă sau plectonemială poate să se realizeze în diplotenul timpuriu sau ceva mai tîrziu. Spiralizarea internă a cromozomilor meiotici este de două feluri, mică (cu un număr mare de spire) și mare (cu un număr mic de spire). Spiralizarea mare corespunde spiralizării somatice sau paranemiale. Spiralizarea remanentă (relictă) se păstrează în cursul

interfazei și la începutul profazei, cînd este înlocuită de un nou ciclu de spiralizare. Durata ciclului de spiralizare a cromozomilor în meioză este cu mult mai mare decît în mitoză. Se consideră că spiralizarea cromozomilor este determinată de un anumit raport ADN-histonă. Caracterul spiralizării, dimensiunea și numărul spirelor, se află sub controlul genetic.

Spiralizarea și despiralizarea reglează activitatea structurilor cromozomale. Prin spiralizare intensă se micșorează puternic sinteza ARN nuclear și nucleolar care se repercutează nemijlocit asupra altor procese de sinteză din organism. Sînt păreri, potrivit cărora, zonele heterocromatice reprezintă prin sine factorul intern nuclear, ce controlează ciclul cromozomilor și funcționarea lor.

În cadrul ciclului meiotic, în spermatogeneză, apar modificări în conținutul nucleoproteic al nucleului. Apare un nou tip de proteină nucleară bogat în arginină și cu bazicitate crescută. La trecerea de la spermatidă în spermatozoid, histona, bogată în arginină, este înlocuită de protamină care conține peste 90% arginină și nouă aminoacizi aromatici.

c. *TRECEREA DE LA CICLUL MITOTIC LA CICLUL MEIOTIC*

Sînt unele date care vin să explice căile de trecere de la diviziunea mitotică la aceea meiotică. Dar în această problemă sînt încă multe incertitudini.

Apariția conjugării somatice și reducția somatică prezintă un interes deosebit pentru stabilirea trecerii de la mitoză la meioză. Și în mitoză s-a remarcat uneori conjugarea cromozomilor omologi, așa cum a evidențiat Stern la Drosofila. Ulterior, conjugarea somatică și reducția (pseudomeioză) au fost evidențiate și la alte organisme animale și vegetale.

La plantele poliploide, ce prezintă mozaicisme, în mitoză se desfășoară asemenea fenomene de conjugare somatică și de reducere a numărului de cromozomi, mai ales la cele care se înmulțesc vegetativ. Un caz clasic de conjugare somatică este acela al cromozomilor politeni de la diptere, care se află în stare de conjugare somatică, brațele lor fiind reprezentate de cromozomi obișnuiți, rămași conjugați pe toată lungimea lor. Reducerea numărului de cromozomi la tomatele octoploide are loc, după unele date, nu numai pe baza reducerii cromozomale, realizată în timpul meiozei, ci și pe seama conjugării somatice și reducerii numărului de cromozomi în cadrul mitozelor premeiotice. Asemenea reducere somatică poate avea loc și la hibrizii intergenerici: grîu-secară; grîu-pir etc. Hiraoka con-

sideră că la Daphne odorea, sinapsisul somatic este asemănător celui meiotic. Conjugarea cromozomilor în mitoza ce precede meioza este de regulă de tipul end-to-end (cap-la-cap) şi latură-pe-latură (side-by-side) ceea ce poate asigura o conjugare în meioză şi în acelaşi timp scurtarea duratei acesteia. După unii autori, la majoritatea organismelor diploide, înainte de meioză are loc o împerechere somatică, în mod curent. După împerecherea somatică, în cursul evoluţiei a apărut recombinarea somatică şi apoi a apărut meioza ca o etapă finală a evoluţiei mecanismelor de împerechere somatică a cromozomilor.

În cadrul conjugării somatice se pot forma chiasme şi poate apare fenomenul recombinării somatice, crossing-overul somatic. Conjugarea somatică poate fi indusă şi artificial sub acţiunea diverşilor factori fizici şi chimici, care întîrzie reproducerea cromozomilor, interfaza şi profaza mitotică (fenomenul întîrzierii reproducerii cromozomilor l-am remarcat în ciclul meiotic tipic) condiţionînd conjugarea somatică şi reducţia.

S-a constatat că la formele diploide şi hexaploide de Avena, cromozomii omologi au o distribuţie nerandomizată în mitoză. Caracterele cromozomale precum forma, mărimea şi regiunile organizator nucleolare exercită o influenţă apreciabilă asupra asocierii somatice a omologilor.

Se apreciază că asocierea cap-la-cap a cromozomilor în mitoză are semnificaţie în conjugarea meiotică a omologilor, facilitînd un sinapsis rapid şi regulat. În experienţe cu lizină, arginină şi arginină + lizină, Konstantinov (1971) a constatat dereglări ale mitozei la ceapă şi apariţia fenomenelor de conjugare somatică şi reducţie, ceea ce vorbeşte despre rolul acestor aminoacizi, care intră în compoziţia histonelor, în modificările structurale ale cromozomilor din ciclul mitotic şi meiotic. Şi alţi aminoacizi, precum metionina şi alanina, au determinat conjugarea somatică şi reducţia. Schimbarea timpului şi intensităţii sintezei complexelor macromoleculare de bază în ciclul meiotic, spre deosebire de cel mitotic, reprezintă una din condiţiile necesare conjugării cromozomilor omologi. Spontan, sau sub influenţa anumitor factori, această schimbare poate să aibă loc şi în ciclul mitotic, determinînd, în consecinţă, fenomenele de conjugare şi reducere somatică.

În ciclul meiotic, deficienţele în funcţionarea tapetumului (ţesut trofic pentru meiocite) sînt contracarate prin preluarea acestui rol de către o parte din celulele sporogene, care însă pierd capacitatea de a se divide meiotic.

Rolul trofic pentru megasporocite îl are nucela ovulului. Celulele tapetumului se pot divide mitotic fără interchineză, din care cauză ele sînt binucleate. Uneori cînd diviziunea mitotică este dereglată, rezultă un nucleu tetraploid halteriform. Celulele tapetumului pot prezenta de asemeni nuclei poliploizi, rezultaţi prin endomitoză. Activitatea mitotică a tapetumului se micşorează spre sfîrşitul diviziunii meiotice. Contactul intim dintre celulele tapetumului şi microspori permite trecerea enzimelor specifice din tapetum în microspori. S-a vorbit şi despre o trecere de cromatină sau acizi nucleici din tapetum în microspori. Funcţionarea activă a celulelor tapetumului în cursul diferenţierii microsporocitelor determină intrarea acestora în meioză. Se vorbeşte aşadar despre o inducţie enzimatică a meiozei microsporocitelor.

Experienţele lui Konstantinov (1971) cu omogenate din spice de grîu, secară, mei şi stamine de Lilium, în perioada cînd acestea terminaseră pregătirea pentru meioză sau începuseră profaza I, au arătat că acestea determină conjugarea somatică în profază şi metafază, iar în anafază, separarea cromozomilor omologi la radicelele de Vicia faba, Crepis capillaris şi Haplopappus gracilis în proporţie de 12,1 pînă la 47,0%. Nu acelaşi lucru s-a constatat cînd s-au folosit omogenate fierte. În concluzie, Konstantinov apreciază că ţesuturile care înconjoară meiocitele iau parte la diferenţierea acestora şi la trecerea lor în meioză. Acelaşi lucru este valabil şi pentru megasporocite şi pentru meiocitele animale. Se poate aprecia că, spre deosebire de ciclul mitotic, ciclul meiotic este mai puţin autonom, particularitate ce a apărut în cursul evoluţiei organismelor cu reproducerea sexuată. Meioza cu o singură diviziune, ca şi conjugarea somatică şi reducţia somatică demonstrează că, între mitoză şi meioză nu există o graniţă absolută, procesele meiotice şi mitotice fiind caracterizate de un oarecare grad de reversibilitate.

Evoluţia a avut ca sens dobîndirea stării diploide (prima stare de redundanţă a materialului genetic) care a asigurat o mai mare constanţă a transmiterii caracterelor, o integralitate a complexelor genice, stabilizarea ontogenezei şi homeostazia genetică. Între starea diploidă şi haploidă se interpune meioza la organismele cu reproducere sexuată, iar fecundarea apare ca un mecanism compensator al meiozei.

Capitolul IX

CICLUL CELULAR — ETAPELE REPARTIZĂRII PRODUȘILOR DE REPLICAȚIE

A. DIVIZIUNEA MITOTICĂ

1. SEMNIFICAȚIA BIOLOGICĂ A MITOZEI

Viața sistemelor biologice este limitată. Pentru asigurarea continuității lor ca și, dealtfel, și pentru existența sistemelor biologice de-a lungul unei perioade de timp mai lungi, este necesară reproducerea acestora. Creșterea celulei (a dimensiunilor și volumului celular) se desfășoară pînă ce se ating anumite limite peste care celula nu mai poate trece. Reproducerea este determinată, pe lîngă alți factori, și de capacitatea limitată a celulelor de a crește, capacitate care, în mod normal, asigură doar dublarea masei celulare. Diviziunea celulară apare ca un proces complex prin care se produc celule noi, capabile de creștere. În acest fel se asigură reproducerea celulelor, perpetuarea lor de-a lungul generațiilor.

Fenomenul diviziunii nucleare a fost observat pentru prima dată de către Dumortier, la 1832, la alga Conferva aurea și de către Cisteakov, în 1871. La animale, acest fenomen a fost observat încă din 1827. Ulterior, Schneider, Strasburger, (la 1875) apoi Schleicher și Flemming, au descris acest fenomen fascinant, un mecanism biologic fundamental prin care se asigură înmulțirea celulelor și în același timp un mijloc prin care se asigură distribuirea genelor asemănătoare la celulele fiice identice, această distribuire de aceleași gene la celulele fiice fiind condiționată de existența ADN-ului sub formă dublu-catenară și de mecanismul semi-conservativ de replicare a acestuia.

Este surprinzător că se cunosc fapte precise legate de citologia diviziunii celulare, fiziologia și biochimia procesului de diviziune, dispunem de un model perfect prin care se explică replicarea exactă a materialului genetic, dar se cunoaște încă prea puțin despre esența diviziunii celulare.

În procesul diviziunii celulare se pot remarca două categorii de evenimente: evenimente reproductive — prin care sînt dublate potențialitățile funcționale ale celulei, esențială fiind dublarea cromozomilor, purtători de molecule ce dețin informația genetică și evenimente distributive — prin care materialul parental, rezultat al replicației, este repartizat celulelor fiice.

Celula rezultată din diviziune se află în fața unei alternative: diferențierea sau repetarea diviziunii. Cînd și cum se realizează „decizia" pentru una din aceste două căi reprezintă încă un domeniu de cunoaștere limitată. Potențialitatea diviziunii se poate conserva și la celulele diferențiate dar ea este exprimată foarte rar și numai cînd este indusă secundar. Nu același lucru se întîmplă la celulele nediferențiate, meristematice, la care capacitatea de a parcurge repetate cicluri celulare este păstrată permanent. Rostul diviziunii, prin evenimentele sale reproductive și distributive, este acela de a menține continuitatea istorică a sistemului biologic (a celulei) prin transmiterea modelelor cromozomale, în al căror ADN este înscrisă informația genetică, de la celula mamă la celulele fiice. Stabilitatea sistemului biologic celular este determinată de stabilitatea modelului cromozomal. Mitoza asigură perpetuarea cromozomilor cu toate caracteristicile lor. Cu producerea a două celule fiice, celula mamă își pierde individualitatea, celulele fiice moștenind mai mult sau mai puțin neschimbate potențialitățile celulei mamă. Celulele fiice ale celulei fiice vor fi la fel, lăsînd astfel imaginea unei aparente nemuriri (D. Mazia, 1961). Dar, privind astfel lucrurile, se uită principiul heraclitean al continuei transformări, deveniri, în natură. Aparenta stabilitate este însoțită de noi valențe, adăugate caracteristicilor sistemului biologic cu fiecare generație celulară. Rezultă că „nemurirea" celulară, mai ales la unicelulare (unde fiecare celulă reprezintă un individ organic) nu este chiar atît de monotonă în realitate. La organismele multicelulare, unele celule se diferențiază devenind celule germinale, care asigură continuitatea sistemului biologic din generație în generație. Asemenea celule diferențiate încetează să se reproducă și ele îmbătrînesc cu timpul. În reproducerea celulelor pot să apară greșeli pe care evoluția le poate sau nu perpetua. Asemenea greșeli sînt în esență fenomene mutaționale.

Caracteristica centrală a reproducerii celulare este reproducerea nucleului. În același timp este reprodusă și masa citoplasmatică care intră în „sfera de influență" a nucleului pe care Strasburger a numit-o, încă din 1893, „wirkungssphaere", noțiune reluată ulterior de către Hertwing sub numele de „kernplasmarelation" adică relația

nucleu-citoplasmă, cu implicaţii majoare în determinarea momentului diviziunii.

Unităţile funcţionale ale celulei au o durată de viaţă limitată, din care cauză trebuiesc înlocuite. Înlocuirea se realizează în cadrul evenimentelor reproductive ale diviziunii.

2. CINETICA DIVIZIUNII CELULARE

Planul minim şi general al mitozei cuprinde duplicarea cromozomilor şi a centrilor mitotici, separarea spre poli opuşi a centriolilor fii şi deplasarea spre aceşti poli a cromozomilor fii. În procesul mitozei este organizat aparatul mitotic — un ansamblu de structuri compuse din figuri „cromatice" şi „acromatice" — care este complet abia în echilibrul metafazic (D. Mazia, 1961). Reproducerea cromozomilor nu depinde de reproducerea prealabilă a centriolilor, aceste evenimente fiind în fond pregătiri paralele dar separabile, ale diviziunii. Sinteza proteinelor care participă specific la ansamblarea aparatului mitotic este o condiţie prealabilă a diviziunii. Din această cauză, necesităţile energetice sînt foarte ridicate tocmai în această perioadă a pregătirii celulei pentru diviziune.

După replicarea ADN-ului, evenimentele care se derulează în procesul diviziunii sînt: apariţia cromozomilor, spiralizarea şi condensarea cromozomilor, dizolvarea membranei nucleare şi a nucleolului (sau nucleolilor cînd sînt mai mulţi), formarea fusului de diviziune, dispunerea cromozomilor în placa ecuatorială, separarea celor două cromatide ale unui cromozom (clivarea longitudinală a cromozomului) şi migrarea lor spre poli opuşi. Se formează apoi nucleolii noi, o nouă membrană nucleară şi apare un perete despărţitor între celulele fiice. Acestea sînt procese ce realizează un tot unitar, o desfăşurare unică şi continuă, pe care, din motive de înţelegere mai precisă a lor, au fost încadrate în diferite faze ale diviziunii: profază, metafază, anafază, telofază (Fig. 72).

a. *INTERFAZA*

În interfază nucleul are o poziţie variată în celulă, în funcţie de forma celulei şi stadiul de dezvoltare al său: în celulele meristematice sau embrionare, el are poziţie centrală, pe cînd în celulele adulte are poziţie excentrică. Dimensiunea este variabilă, de la 1—2 μm la drojdii, la 10—50 μm la plantele superioare şi 10—30 μm la animale. Forma sa este variată: sferică, lenticulară, fusiformă etc.

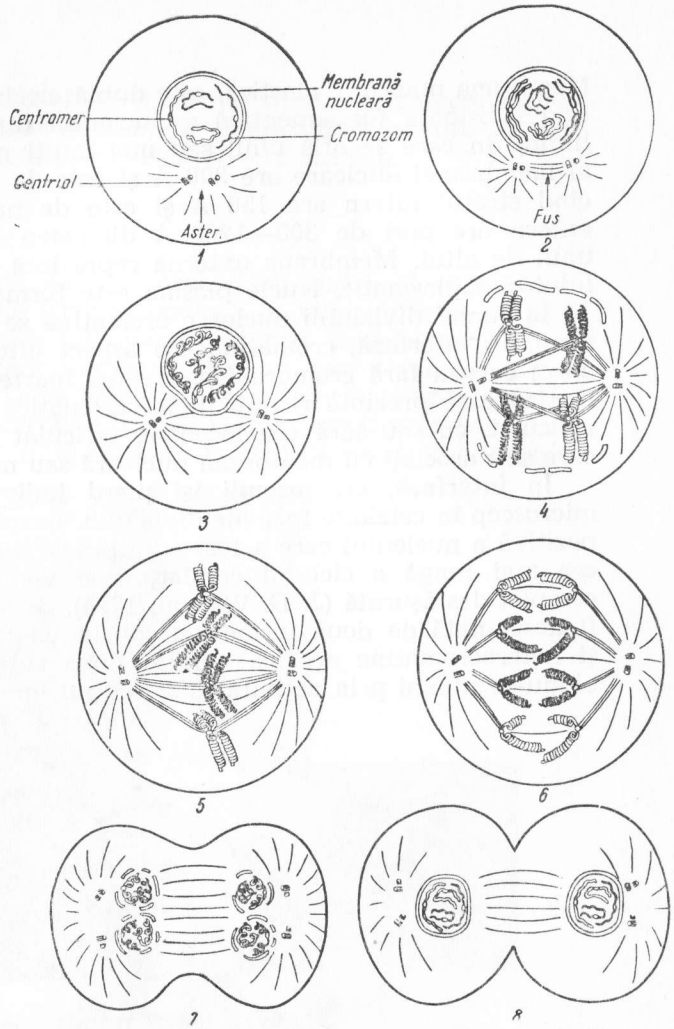


Fig. 72 — *Schema diviziunii mitotice* (după D. Mazia, 1961). *1.* Interfază — nucleul este separat de citoplasmă prin membrana nucleară. Cromozomii, doi de proveniență paternă (negri) şi doi de proveniență maternă (albi), se află în stare extinsă şi invizibili la microscopul optic. Ei sînt replicaţi în timpul interfazei în vederea diviziunii. În citoplasmă, în apropierea membranei nucleare se află doi centrioli „parentali", fiecare însoţit de un centriol „fiu" mai mic; *2, 3,* şi *4* — Profaza — începe manifestarea aspectelor vizibile ale diviziunii. Cromozomii se condensează în structuri dense, compacte. Cei doi cromozomi fii, care au rezultat din replicarea cromozomului parental, apar ca o pereche de cromozomi uniţi la nivelul centromerului. Dispare membrana nucleară. Perechile de centrioli se deplasează la locurile ce vor deveni polii celulelor fiice. În timpul acestei mişcări, centriolii radiază un aster de fibre în toate direcţiile. Fibrele care fac o punte între cele două perechi de centrioli formează o structură numită fus. Centromerii cromozomilor fii, uniţi la nivelul lor, se ataşează la fibrele fusului; *5.* Metafaza — perechile de cromozomi se deplasează la ecuatorul fusului şi centromerul clivează; *6.* Anafaza — Fibrele fusului trag cîte un membru al fiecărei perechi de cromozomi fii la polii opuşi ai fusului. În acest stadiu începe procesul clivării celulare, care la celula animală se realizează prin formarea unei strangulaţii (constricţii) de la periferia celulei spre interiorul său, iar la celulele plantelor derivă din creşterea unui nou perete celular dinspre interior spre periferie prin formarea fragmoplastului; *7—8* Telofaza — Cromozomii fii ajung la poli prin migrare. Fenomenele din profază au acum o desfăşurare în sens opus. Se formează două membrane nucleare fiecare incluzînd un set de cromozomi pentru fiecare nucleu fiu, dispar fibrele fusului de divizare iar cromozomii se dezorganizează, devenind invizibili. În citoplasmă, fiecare centriol s-a replicat aşa încît acum sînt prezenţi mai curînd 8 decît 4. Procesul de clivare celulară se desăvîrşeşte, separîndu-se două celule fiice.

Membrana nucleară, elastică, este dublă electronmicroscopic, delimitînd substanţa fundamentală a nucleului (nucleoplasma sau cariolimfa), în care se află unul sau mai mulţi nucleoli. Stratul extern al membranei nucleare are 300 Å şi este de natură lipoproteică, pe cînd stratul intern are 150 Å şi este de natură proteică. Stratul extern are pori de 300—1200 Å diametru la intervale de 1500Å unul de altul. Membrana externă reprezintă o continuare a reticulului endoplasmatic. Nucleoplasma este formată din cromatină.

În cursul diviziunii nucleare cromatina se organizează în cromozomi. În interfază, cromatina are aspect diferit: reticulat (Fig. 73, a—c) cu sau fără cromocentre, o reţea foarte fină de fibre de cromatină care prezintă regiuni heterocromatice intens colorate, semireticulat, cu sau fără cromocentre, reticulat dar cu procromozomi, care sînt asociaţi cu membrana nucleară sau nucleolul.

În interfază, cromozomii îşi pierd individualitatea vizibilă la microscop în celelalte faze ale diviziunii, formînd substanţa Feulgen-pozitivă a nucleului care a fost numită „cromatină", în această fază, cea mai lungă a ciclului celular, cromozomii îmbrăcînd o formă complet desfăşurată (J. D. Watson, 1974). Starea cromozomilor poate fi desemnată de două forme ale substanţei cromatice; eucromatina şi heterocromatina acestea nefiind două substanţe diferite, deosebindu-se numai prin activitatea şi timpul lor de replicare, de obicei

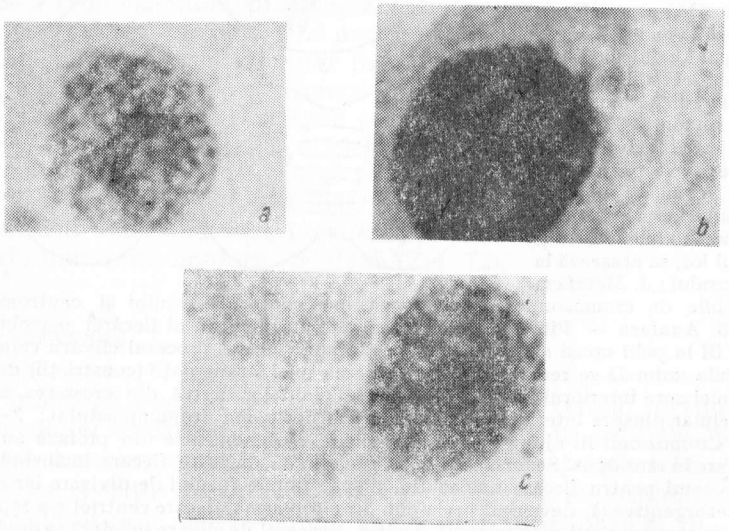


Fig. 73 — *Diviziunea mitotică la Allium cepa* (original). *a—c* interfază;

heterocromatina replicîndu-şi ADN-ul mai tîrziu decît eucromatina. După cum am văzut heterocromatina şi eucromatina sînt, aşadar, două stări diferite ale aceleiaşi substanţe — cromatina.

b. *PROFAZA*

Profaza este anunţată de începerea spiralizării şi condensării filamentelor cromozomale (cromonemelor). În mod obişnuit, în profază, materialul genetic este organizat sub forma unui filament întortocheat în fel şi chip care formează spiremul lax — ca un ghem, în interiorul nucleului. După acest stadiu, cromozomii apar ca entităţi delimitate, ca nişte corpusculi mult mai compacţi prezentînd cîte două cromatide (Fig. 73, d, e). Fiecare cromatidă prezintă filamente

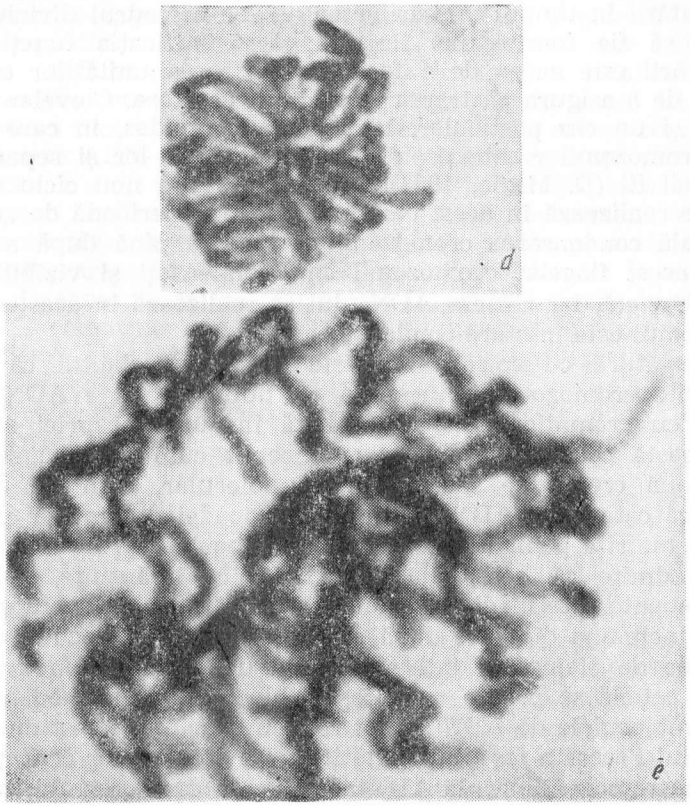


Fig. 73 — *d, e* profază;

spirale numite cromoneme, spire sau giri care apar în profază ca un șirag de mărgele și care se numesc cromomere. Paralel cu micșorarea numărului de spire și cu creșterea diametrului acestora, are loc condensarea cromozomilor și îngroșarea lor. La începutul profazei are loc o primă spiralizare a cromozomilor, numită spiralizarea mică. Spre sfîrșitul profazei are loc a doua spiralizare denumită spiralizarea somatică. Se admite existența și a celei de a treia spiralizări. Spiralizarea presupune numeroase contorsiuni ale cromatidelor suprapuse, ale cromonemelor și substructurilor lor. În timpul diviziunii se desfășoară un ciclu evolutiv bazat pe fenomenele spiralizării și despiralizării cromonemelor

Spiralizarea cromozomilor și condensarea acestora face ca în loc de filamente lungi, întortocheate, cromozomii să se prezinte ca niște organite scurte și groase la care riscul amestecării, împletirii și fragmentării în timpul mișcărilor ce au loc în cadrul diviziunii nucleului, să fie foarte mic. Rezultă că semnificația funcțională a condensării este aceea de a facilita deplasarea unităților cromozomale și de a asigura păstrarea integrității acestora. Cleveland a evidențiat și un caz particular, la Holomastigotoides, în care spiralizarea cromozomilor este posterioară duplicației lor și separării lor în nucleii fii (D. Mazia, 1961). Intrarea într-un nou ciclu de diviziune se realizează în acest caz după o lungă perioadă de „repaus". De regulă condensarea cromozomilor durează pînă după metafază, dar la acest flagelat cromozomii sînt condensați și vizibili în tot ciclul de viață, iar sinteza ADN-ului se realizează în acest caz cînd cromozomul este în stare condensată.

În legătură cu spiralizarea este de reținut faptul că fiecare subunitate cromozomală, începînd cu dubla-elice de ADN și terminînd cu cromatidele este încolăcită în jurul propriei sale axe. Din această cauză este greu de conceput cum are loc separarea celor două cromatide sau, la nivel molecular, cum se desprind cele două catene de ADN, în timpul perioadei de sinteză, pentru a servi ca matriță pentru sinteza noilor molecule de ADN. Ipoteza lui Freese admite că helixurile de ADN sînt înlănțuite, spiralizate prin elemente intermediare. de natură chimică încă necunoscută, în așa fel încît una din cele două catene ale macromoleculei de ADN se prinde de elementul intermediar la un anumit punct, pe cînd cealaltă catenă se prinde mai jos, pe elementul intermediar. Astfel prinse, moleculele de ADN se pot roti cu ușurință. Acest model ipotetic al lui Freese a fost îmbunătățit de Taylor. Taylor concepe prinderea macromoleculelor de ADN de o bandă care prezintă contractilitate diferită pe margini și în partea centrală.

Contracția diferențială a acestei benzi determină formarea unei structuri spiralate (J. H. Taylor, 1958). Ipoteza lui J. H. Taylor postulează că dublele helixuri de ADN stau perpendicular pe axa lungă a cromozomului, continuitatea longitudinală fiind menținută de o pereche de lame de natură proteică. O catenă a fiecărui dublu helix de ADN este ancorată de o lamă proteică, pe cînd cealaltă catenă de a doua lamă proteică (Fig. 38). Mediul chimic poate determina structura terțiară a cromozomilor, spiralizarea acestora, fapt dovedit experimental în experiențele lui Anderson privind acțiunea vaporilor de amoniac. După acest autor condensarea cromozomilor se datorează în esență proteinelor bazice de tipul protaminelor și histonelor. Moleculele de ADN sînt legate între ele prin articulații histonice. Alte proteine, nehistonice, pot fi asociate cu ADN-ul și proteinele histonice atunci cînd cromozomul este extins, necontractat. În acest caz, grupele de fosfat ale ADN-ului și grupele histonice încărcate pozitiv nu pot reacționa între ele pînă nu este îndepărtată proteina nehistonică. Sub acțiunea policationilor, bunăoară, poate avea loc disocierea proteinelor nehistonice și în acest fel are loc condensarea moleculelor de ADN-histonă. Și alți autori consideră că neutralizarea ADN-ului cu cationi polivalenți duce la spiralizarea cromozomilor. Un alt eveniment care are loc în profază este dizolvarea membranei nucleare și a nucleolilor. Acest eveniment se desfășoară la sfîrșitul profazei. Cercetările cinemicroscopice atestă faptul că dezintegrarea membranei nucleare se realizează foarte brusc, durînd, de exemplu în celulele aflate în profază tîrzie, la endospermul de Haemanthus sp., între 0,5 și 2 minute. Dizolvarea membranei nucleare este un aspect comun dar nu universal al celulelor aflate la sfîrșitul profazei și a fost evidențiat la celulele animale de către Porter, în investigații electronoptice, iar la plante de către Bajer, Porter și Machado.

În numeroase cazuri, s-a demonstrat asocierea cromozomilor cu membrana nucleară, cromozomii profazici fiind adesea aranjați la periferia nucleului în contact cu membrana nucleară. De asemenea apare neobișnuită interacțiunea dintre cromozomi și centri mitotici la unele organisme inferioare, remarcîndu-se polarizarea cromozomilor spre acești centri, înainte ca să fie dizolvată membrana nucleară. Interesant este că în această atracție sînt antrenate capetele cromozomilor mai curînd decît centromerii. Aceasta atestă faptul că mișcarea cromozomilor poate începe înainte de a avea loc dizolvarea membranei nucleare, cromozomii fiind sub controlul centrilor mitotici încă din fazele timpurii ale diviziunii. De aici se poate trage concluzia că membrana nucleară nu reprezintă o barieră între cromozomi și aparatul mitotic de îndată ce acesta a devenit activ.

Microscopia electronică a mai evidenţiat şi o agregare de membrane citoplasmatice în jurul nucleolului şi fusului de diviziune, agregare care la microscopul optic dă impresia persistenţei membranei nucleare. Studii efectuate la Drosophila virilis, cu ajutorul microscopului electronic, au confirmat o asemenea dispoziţie a reticulului endoplasmatic, în spermatogeneza acestei insecte.

Sînt grupe de organisme, ca protozoarele şi algele la care membrana nucleară persistă în mod obişnuit în timpul diviziunii nucleare. Dar şi în acest caz se constată o modificare structurală a membranei nucleare în sensul că este dezintegrat stratul interior al acesteia.

Sînt de asemenea numeroase cazuri în care se formează un fus de diviziune intranuclear, cum se întîlneşte de exemplu la alge Cladophorales. S-a constatat că dizolvarea membranei nucleare este precedată de acumularea mitocondriilor în jurul nucleului şi se consideră că mitocondriile participă la liza enzimatică a membranei. În acest proces de liză a membranei nucleare, se acordă un rol important lizozomilor. Membrana nucleară se rupe brusc, în cîteva minute în urma tracţiunilor şi pulsărilor exercitate de către microtubuli. Există o anumită relaţie între modificările membranei nucleare şi contracţia cromozomilor. Cu toate acestea, experienţe de tratare cu mercaptoetanol au arătat că păstrarea membranei nucleare la celulele intrate în diviziune nu afectează scurtarea cromozomilor şi trecerea lor în condiţie metafazică.

La microscopul electronic s-a putut evidenţia fragmentarea membranei nucleare în fragmente prea mici pentru a putea fi observate la microscopul optic. Fragmentele formate se rotunjesc spre a forma vezicule care ulterior sînt identificate în citoplasmă. Fragmentele îşi păstrează ultrastructura tipică (membrană dublă şi pori) numai în unele cazuri porii dispărînd.

Dispariţia nucleolului este un fenomen frecvent şi are loc tot spre sfîrşitul profazei. Sînt controverse încă referitoare la faptul dacă substanţa lui rămîne dispersată în apropierea cromozomilor sau dacă se depune pe aceştia. Substanţa nucleolară se deplasează pe filamentele cromozomale, participă la comportamentul său mitotic şi este purtată de acestea în nucleii fii. Se apreciază că o parte sau toată substanţa nucleolară poate participa la formarea fusului din care cauză substanţa fusului este de natură ribonucleoproteică. De asemenea, se realizează un interschimb de ribonucleoproteine şi desigur şi alte substanţe între nucleu şi citoplasmă, în timpul mitozei. Se apreciază că nucleolii ar avea funcţia de a pregăti celula

pentru diviziune, fapt dedus din vătămarea nucleolilor în interfaza neuroblastelor de lăcustă, vătămare care a determinat inhibarea diviziunii celulare.

S-a demonstrat că nucleolii reprezintă locuri de sinteză a ARN-r şi a particulelor ribozomale. S-a evidenţiat faptul că sinteza ARN nucleolar se desfăşoară independent de sinteza ADN din cromozomi. Sinteza ARN nucleolar încetează în timpul profazei I-a în celulele mamă polinice de la porumb în care nucleolii persistă în timpul meiozei. În celulele în care nucleolii dispar la sfîrşitul profazei, are loc refacerea lor la sfîrşitul diviziunii. Ei sînt refăcuţi la nivelul unor zone specifice ale cromozomilor organizatori nucleolari. Sînt grupe de organisme, precum euglenoficeele la care nucleolul joacă un rol deosebit în timpul diviziunii nucleare. S-a arătat că dizolvarea sau persistenţa nucleolului este un caracter specific de specie la graminee, avînd semnificaţie taxonomică. Uneori nucleolul se poate deplasa în plan ecuatorial, în metafază, şi este împărţit în două jumătăţi, care apoi sînt deplasate spre poli. Cînd este localizat la un pol, el nu se mai divide. În celulele animale, în mod obişnuit,nucleolii nu persistă în timpul diviziunii. S-a dovedit experimental, că sărurile de cobalt împiedică dizolvarea nucleolului.

Substanţa de bază a nucleolului este ARN-ul. ARN-ul nucleolar poate servi ca mediator între materialul genetic al cromozomilor şi sistemele sintetice ale citoplasmei, idee care datează încă din 1940, aparţinînd lui Caspersson şi Schultz. Rolul nucleolului în diviziune pare a fi esenţial. S-a arătat că dacă celulele de Vicia faba pierd nucleolii nu se mai pot divide.

Tot la sfîrşitul profazei, cînd membrana nucleară începe să se dezintegreze, în celulă apare o structură fuziformă fibrilară. Este fusul de diviziune. În celulele animale, ca şi la multe grupe de plante inferioare, la polii fusului de diviziune se află centriolii. La plantele superioare la care nu s-a constatat prezenţa centriolilor, organizarea polilor fusului de diviziune este încă puţin cunoscută. În general în celelalte organisme se cunoaşte că la sfîrşitul profazei, lîngă nucleu apare un corpuscul — centrozomal, care se divide în două părţi şi se separă mergînd în două direcţii opuse, polarizînd celula. Starea staţionară a polilor fusului este menţinută de arhitectura citoplasmei mai ales la plantele superioare. La organismele flagelate sau ciliate, centriolii reprezintă primordia organelor locomotoare din care îşi au originea flagelii sau cilii, fapt evidenţiat de microscopia electronică. Fusul de diviziune este alcătuit din fibre continui care leagă cei doi poli ai săi şi din fibre

cromozomale care unesc polii cu centromerii cromozomilor. Fibrele fusului reprezintă microtubuli de 130—270Å.

Ansamblul fus nuclear, centrioli şi cromozomi reprezintă aşanumitul aparat mitotic. Constituenţii proteici ai fusului nuclear se sintetizează încă din interfază. Experienţe cu cloramfenicol dovedesc că inhibiţia formării fusului nuclear are loc numai atunci cînd inhibitorul sintezei proteice este administrat înainte ca centriolii divizaţi să se despartă în profază şi să stabilească polii mitotici. Se admite că fusul nuclear este alcătuit, în timpul profazei, din molecule formate anterior, în interfază. Această părere se bazează pe observaţiile lui Lebdetter şi Porter asupra prezenţei unor structuri microtubulare în citoplasma unor celule de la organismele superioare care sînt aproape identice cu substructurile fusului. Este posibil ca fusul să se formeze din asemenea elemente preformate.

Proteinele ce intră în compoziţia fibrelor fusului de diviziune sînt formate din molecule globulare proteice unite prin grupări bisulfitice (—S—S—) devenind astfel fibroase, fiind sintetizate înainte de desfăşurarea diviziunii. Ele sînt de natură apropiată acelora nucleolare din care cauză se admite că nucleolul elaborează materialul aparatului mitotic. Proteina fusorială este o ribonucleoproteină. Structura primară a fusului, care se formează în momentul dizolvării membranei nucleare, constă dintr-un sistem de fibre continui, care merg de la un pol la celălalt. Cînd cromozomii iau contact cu această structură primară a fusului, centromerii lor sînt responsabili pentru organizarea secundară a sistemului fusorial, adică de formarea semifibrelor cromozomale.

După formarea fusului de diviziune are loc mişcarea cromozomilor. Prima fază a mişcării cromozomilor culminează cu stabilirea cromozomilor în poziţie metafazică. Acest prim stadiu al mobilizării cromozomilor s-a numit *Prometafază* sau *metachineză*. Prometafaza durează de regulă puţin. În ea are loc deplasarea cromozomilor spre un punct plasat imediat între poli. Urmează alinierea cromozomilor în placa ecuatorială şi ataşarea cromozomilor fii la polii opuşi ai fusului, prin intermediul semifibrelor cromozomale ale fusului de diviziune.

Dizolvarea membranei nucleare şi începutul migraţiei cromozomilor sînt evenimente coincidente în timpul diviziunii. La unele organisme membrana nucleară rămîne intactă în timpul diviziunii, aşa cum se întîmplă la protozoare, unele alge, drojdii iar la majoritatea organismelor, dizolvarea membranei nucleare nu mai poate fi iniţiatorul migrării cromozomilor. Răspunzător pentru migrarea cromozomilor este deci fusul de diviziune, pe de o parte, şi funcţionarea regiunii centromerice a cromozomului pe de alta. Iradierea

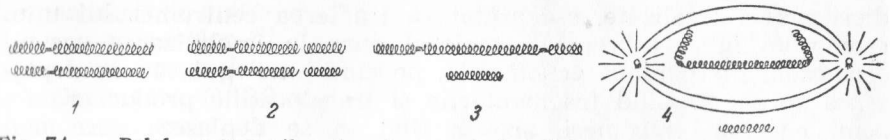


Fig. 74 — *Rolul centromerilor (zonele negre) în diviziune. 1.* cromozomi normali; *2.* fragmentarea cromozomilor supuşi iradierii; *3.* unirea fragmentelor care au centromeri; *4.* în diviziune, fragmentele centrice sînt atrase spre poli pe cînd cele acentrice nu participă la diviziune (după D. Mazia, 1961).

centromerului cu raze ultraviolete de exemplu, blochează migrarea cromozomului, lucru care nu se întîmplă atunci cînd este iradiat restul cromozomului sau citoplasma.

Mişcarea cromozomilor din poziţia lor de la sfîrşitul profazei în poziţie metafazică depinde de interacţiunea cromozomilor cu polii fusului de diviziune şi este similară în esenţă cu mişcarea anafazică a cromozomilor fii. Mişcarea cromozomilor în timpul mitozei depinde de regiuni specializate ale lor, numite centromeri, puncte de ataşare a cromozomilor la aparatul mitotic. Rolul esenţial al centromerilor în deplasarea cromozomilor este dovedit de faptul că la cromozomii fără centromeri nu este posibilă deplasarea prometafazică sau anafazică, pe cînd cromozomii care prezintă deleţii ale braţelor dar au intacte regiunile centromerice sînt capabili de asemenea mişcări (Fig. 74).

La organismele cu centromeri difuzi cum ar fi scorpionul, unele insecte, Luzula, Spirogyra, mişcarea anafazică se realizează ca şi cînd cea mai mare parte a cromozomului sau cromozomul pe întreaga sa lungime este ataşat de poli. Cînd cromozomii cu centromeri difuzi se fragmentează, fragmentele acestea păstrează capacitatea de a se „ataşa“ de poli. La nivelul centromerului se inseră fibrele cromozomale. Termenul de fibre cromozomale a fost introdus de către Schrader, la 1944; Bajer le numeşte fibre cinetochore. Ele sînt fibre la care aderă cromozomii în metafază. Fiecare fibră cromozomală reprezintă un mănunchi de 70—150 microtubuli. Blocarea cromozomilor în metafază poate fi urmarea represiei sintezei proteice la locul cinetochorului, fapt evidenţiat în experienţe cu ciclohexamină. Se admite că proteina sintetizată în cinetochor participă la formarea fibrelor cromozomale spre sfîrşitul prometafazei.

Nu s-a putut demonstra prezenţa ADN-ului la nivelul centromerului. DN-aza nu afectează regiunea centromerică. În cele mai multe cazuri, centromerul apare Feulgen-negativ deşi sînt şi unele date contrare. Folosindu-se tehnica microbeam (microfasciculului) de iradiere cu U.V. sau cu protoni, prin care se pot realiza ira-

dieri precis localizate, s-a arătat că iradierea centromerului unui cromozom în metafaza I a meiozei duce la imobilizarea acestui cromozom în regiunea ecuatorială, pe cînd omologul său se deplasează spre pol. Cînd fragmentările și translocațiile produc cromozomi cu doi centromeri, aceștia tind să se deplaseze spre poli opuși, dînd o punte anafazică. Interesant este efectul iradierii centromerilor la Haemanthus, în anafază. În acest caz, cromozomii tind să se întoarcă în regiunea ecuatorială.

La unele varietăți de porumb, Rhoades a constatat un caz interesant de activitate neocentrică, în care capetele cromozomilor sînt puternic trase spre poli, în meioză, pe cînd centromerii normali sînt încă în plan metafazic. Capetele cromozomilor funcționează în acest caz asemănător centromerilor (Mazia, 1961).

c. *METAFAZA*

În metafază cromozomii sînt duplicați, duplicarea lor realizîndu-se deja în interfază, cînd se află în stare destinsă. Singura porțiune din cromozom rămasă neduplicată, și care se duplică în timpul stării contractate din metafază, este regiunea centromerului, cînd cromozomul este complet duplicat; cu excepția centromerului, cromozomul este format din două cromatide: o cromatidă se transformă într-un cromozom de îndată ce centromerul s-a divizat. Acest lucru se realizează în trecerea de la metafază la anafază. Lima-de-Faria apreciază că în metafază cinetochorul este dedublat ca și restul cromozomului.

Metafaza este caracterizată de organizarea plăcii ecuatoriale sau metafazice (Fig. 73, f, g). Aceasta înseamnă ordonarea centromerilor într-un singur plan, la ecuatorul figurii de diviziune, perpendicular pe axa longitudinală a fusului de diviziune care unește cei doi poli ai săi. Brațele cromozomilor, în funcție și de lungimea acestora, pot ieși din acest plan unic în care sînt ordonați centromerii. Fiecare cromozom metafazic are doi centromeri, cîte unul pentru fiecare din cele două cromatide surori, acestea devenind în anafază cromozomii fii.

Distrugerea experimentală a fusului duce la desprinderea cromozomilor din placa ecuatorială. Se admite că o forță alternativă de repulsie și atracție dintre pol și centromer, duce la menținerea cromozomilor în placa ecuatorială și apoi la migrarea lor spre poli în anafază. După Oestergren există un echilibru al forțelor de atracție între poli și centromer; aceleași forțe care țin cromozomul în poziție ecuatorială cît timp centromerul este nedivizat, sînt

responsabile de atracția centromerilor fii spre poli opuși. După Darlington (1963) însă, separarea anafazică a cromozomilor fii apare ca rezultat al repulsiei centromerilor fii. Diviziunea centromerului este ultima etapă în separarea celor două cromatide ale cromozomului (Fig. 75), cromatidele surori devenind ulterior doi cromozomi fii ce se deplasează spre poli opuși în anafază. Semnificația diviziunii longitudinale (clivării longitudinale) a cromozomilor este legată de modalitatea de repartizare cu cea mai mare precizie a materialului ce deține informația genetică, în celulele fiice. Indiferent care este morfologia cromozomului, prin clivare longitudinală se asigură acest deziderat. Este sugestiv exemplul pe care îl dă Goldschmidt, spre o mai deplină înțelegere a semnificației clivării longitudinale a cromozomului. Dacă un sac cu boabe de fasole trebuie împărțit în două jumătăți, se poate proceda prin mai multe mijloace: strangularea cu ajutorul unei sfori a sacului la jumătatea sa, numărarea boabelor și repartizarea în număr egal în două grămezi. Dar și într-un caz și în celălalt, împărțirea nu este exactă: unele boabe sînt mai mari, altele mai mici, unele sînt sănătoase altele stricate. Singura posibilitate care asigură o repartizare exactă ar fi despicarea fiecărui bob în două și separarea jumătății de boabe în două grămezi diferite. Esențial pentru separarea cromozomilor fii apare conectarea acestora la poli

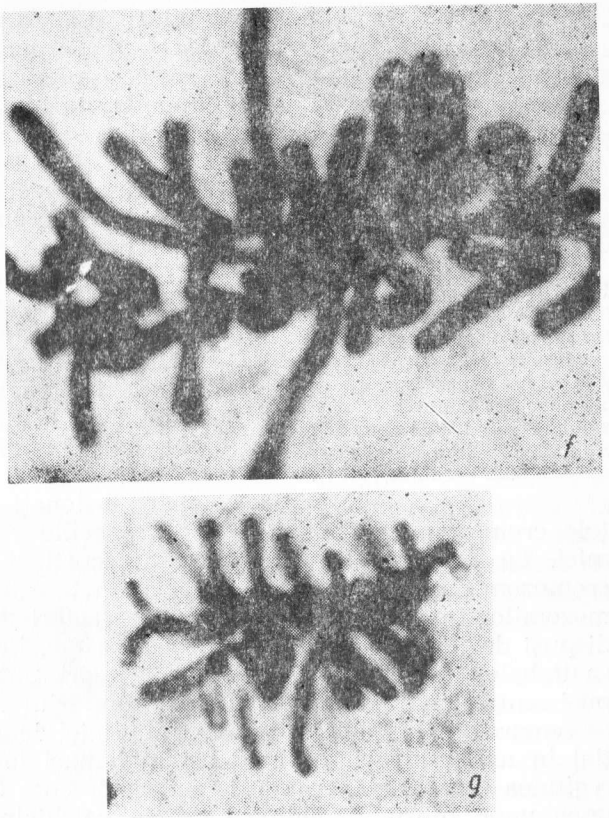


Fig. 73 *f*, *g* — metafază;

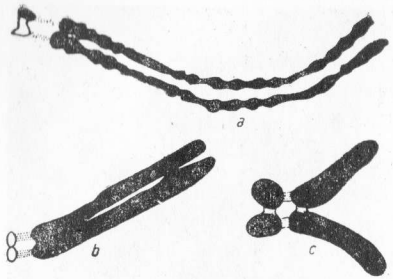


Fig. 75 — *Cromozomi în profaza mitotică la Galtonia candicans (a, b), netrataţi cu colchicină şi, în metafază, la Hyacinthus orientalis* (c) *tratat cu colchicină* şi la care se remarcă separarea regiunilor centromerice înaintea celor ale „matrixului" regiunii adiacente de pe braţele cromozomale (după Lima — de-Faria, din Stebbins, 1971).

opuşi. La foarte multe protozoare şi alte organisme inferioare lipseşte o placă metafazică. Dar, deşi membrana nucleară persistă, cromozomii trec prin toate fazele mitozei tipice. În tuburile polinice, în cadrul mitozei haploide, nu are loc dispunerea cromozomilor într-o placă metafazică.

Poziţia ecuatorială a cromozomilor faţă de polii fusului de diviziune denotă acţiunea egală a celor doi poli asupra cromozomilor.

Forma plăcii metafazice este variabilă de la un fel de celulă la altul, dar constantă la acelaşi tip de celulă. Deseori doar centromerii sînt strînşi ordonaţi în placă pe cînd braţele cromozomilor rămîn libere la speciile cu cromozomi mari şi mici. La organismele cu cromozomi scurţi şi celule mari întregul cromozom pare a fi încadrat în placa metafazică. Aranjamentul cromozomilor în placa metafazică este caracteristic, foarte adesea fiind dispuşi de jur împrejurul plăcii ecuatoriale, în care caz fusul apare ca un halou în secţiune transversală. Alteori, unii cromozomi sînt dispuşi central pe cînd alţii în jurul circumferinţei fusului de diviziune. Se remarcă tendinţa cromozomilor mai mici de a se dispune preferenţial în axa centrală, pe cînd cei mai mari la periferia fusului, în regiunea ecuatorială. Anumiţi factori, precum temperatura sau acţiunea unor substanţe chimice de tip colchicină, influenţează localizarea şi distanţa dintre cromozomi în placa metafazică. Agenţii antimitotici, iradierea sau presiunea hidrostatică determină adesea îngrămădirea cromozomilor într-o masă unică. Caracteristicile, proprietăţile suprafeţei cromozomilor sînt esenţiale în menţinerea caracterului de entităţi discrete şi în comportamentul normal al cromozomilor în metafază.

d. *ANAFAZA*

În această fază a mitozei cromozomii fii se separă şi migrează mai mult sau mai puţin sincron spre poli (Fig. 73, h, i). S-a admis că în timpul migrării anafazice are loc o scurtare a fibrelor cromozomale care unesc cromozomii cu polii şi în acelaşi timp o alungire a fibrelor pol-pol. În acest fel cromozomii sînt atraşi la polii fusului de diviziune.

Separarea cromozomilor fii este evenimentul distinct care marchează trecerea de la metafază la anafază. Viteza de separare anafazică variază între 0,2 μm/minut şi 5 μm/minut, fiind mai mică decît viteza medie cu care sînt mobilizate particulele citoplasmatice în celulă şi care este de 250—500μm/minut. Uneori setul de cromozomi se mişcă aproape perfect sincron formînd „placa anafazică". Dar nu sînt rare cazurile în care unii cromozomi se deplasează precoce, iar alţii cu întîrziere. Alungirea fusului de diviziune favorizează mişcarea cromozomilor. La Barbulanympha, alungirea fusului central reprezintă factorul major al separării cromozomilor.

S-a constatat că deplasarea cromozomilor spre poli se realizează după o linie dreaptă. Fibrele cromozomale, ce

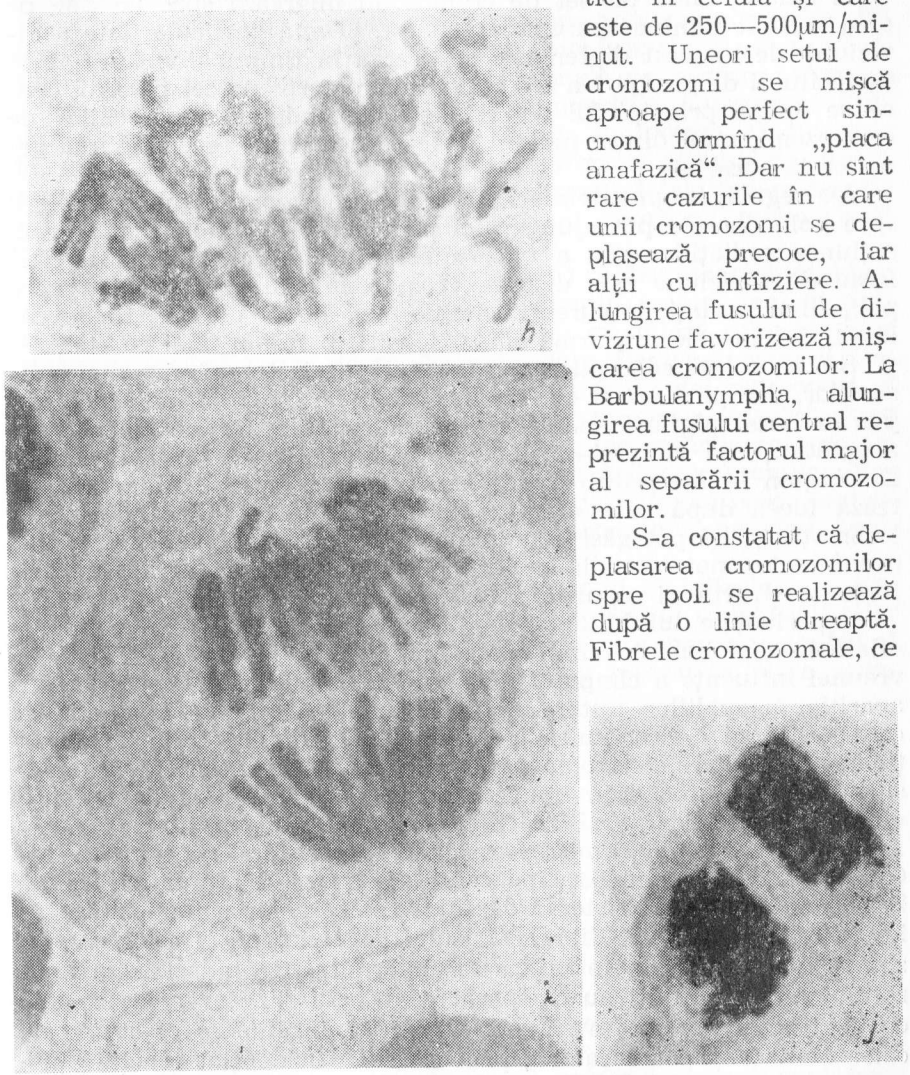


Fig. 73 *h, i* — anafază; *j* — telofază.

leagă cromozomii de poli prin centromerii lor, se contractă la o cincime din lungimea inițială. Mișcarea cromozomilor este continuă, liniară, niciodată accelerată.

Este caracteristică separarea anafazică a cromozomilor la dipterul Sciara, unde un set de cromozomi migrează spre un pol, pe cînd celălalt rămîne aparent la ecuator. O altă particularitate a diviziunii de la acest dipter este separarea în timpul diviziunii spermatocitului de gradul I a cromozomilor materni de cei paterni, ceea ce se opune principiului disjuncției independente a perechilor de cromozomi, unul dintre mecanismele care asigură recombinarea genetică la eucariote.

De regulă, fragmentele acentrice ale cromozomilor nu pot migra spre poli, dar ele pot ajunge aici prin curenții citoplasmatici. Sub acțiunea radiațiilor sau a unor substanțe chimice mutagene, cînd fusul de diviziune este distrus, cromozomii nu sînt separați spre poli, fiind purtați de curenții citoplasmei, fie la un pol, fie la celălalt, dar în cele din urmă sînt dispuși sub forma unei rozete.

S-a căutat să se explice mecanismul mișcării anafazice a cromozomilor, dar pînă acum el este încă neînțeles. Autori mai vechi au pus la baza migrării anafazice a cromozomilor forțele electrice și magnetice, așa cum și-au imaginat Lillie, Bernstein, Kuwada și Darlington la începutul și mijlocul secolului nostru. Metz acreditează ideea după care cromozomii posedă forțe independente de locomoție și își pot găsi drumul lor spre poli, independent. Multe evenimente, mai ales din meioză pot fi descrise ca avînd la bază forțe de atracție și repulsie dintre cromozomi și poli (Mazia, 1961).

Experiențele lui Milovidov și Perakis de expunere a celulelor aflate în diviziune în cîmp magnetic, nu au demonstrat existența vreunei influențe a cîmpului magnetic. Sînt puține date care atestă apariția anomaliilor mitotice sub influența cîmpului magnetic și care susțin că interacțiunea cromozomi-poli implică forțe de atracție sau respingere electromagnetică. Schaede, Burton și Haynes consideră că mișcarea cromozomilor poate fi determinată de curenții citoplasmatici orientați și direcționați de aparatul mitotic.

Pentru a explica mișcarea anafazică, autori precum Szent-Györgyi și Hoffmann—Berling consideră aparatul mitotic ca un gel în care funcționează sisteme de tipul filamentelor actomiozinice ce implică contractilitatea fibrelor fusului de diviziune (a celor cromozomale) ca urmare a modificărilor în gradul de hidratare a aparatului mitotic. Mulți au comparat contracția fibrelor cromozomale cu contracția fibrelor musculare. Cercetări ingenioase efectuate de către Holtzer și colaboratorii, prin care s-a evidențiat reacția anticorp-antigene a proteinelor musculare și a proteinelor fuzoriale

la embrionul de găină, nu au dus la confirmarea ipotezei similitudinii genetice a proteinelor aparatului mitotic cu cele ale mușchilor. Chimic, proteinele izolate din aparatul mitotic arată puține asemănări cu actomiozina.

Se admite că mișcarea cromozomilor spre poli (care nu este întotdeauna mișcarea predominantă în separarea cromozomilor fii) este o consecință a scurtării fibrelor cromozomale și a alungirii fibrelor care leagă polii fusului. Mecanismele de mișcare, alungire și contracție, au fost comparate cu contracțiile musculare. Studiul structurii proteinelor fuzoriale a dus la ipoteza că proteine de natură actinică participă la formarea fibrelor fusului de diviziune. Se consideră că fusul reprezintă o structură labilă care se află într-un echilibru dinamic și care poate fi reversibil polimerizată și depolimerizată.

În cadrul mișcării anafazice, cromozomii se deplasează individual spre poli. Fiecare cromozom din complementul cromozomal se poate deplasa la perioade diferite de timp și cu viteză diferită. Sînt cunoscute însă și cazuri de deplasări în grup. Pentru separarea cromozomilor fii este necesară prezența a cel puțin doi poli opuși ai fusului de diviziune. Celulele care au un singur pol al fusului ajung în anafază dar la nivelul lor nu poate avea loc repartizarea cromozomilor fii în nucleii fii. În realizarea mișcării cromozomilor singura parte din cromozom cu rol semnificativ este, se pare, centromerul. De regulă, autozomii migrează concomitent, pe cînd heterozomii migrează cu viteză diferită.

Se poate ca unul sau mai mulți cromozomi să întîrzie în metachineză. Unii pot fi avansați în plasarea în placa ecuatorială, dar se remarcă o regulă, după care mișcarea și separarea anafazică începe numai după ce toți cromozomii s-au inserat în placa ecuatorială. Regula însă nu este universală.

e. *TELOFAZA*

Reprezintă ultimul stadiu al mitozei. Cromozomii își pierd individualitatea, alveolizîndu-se și anastomozîndu-se, revenind la condiția lor interfazică, nedecelabilă microscopic. Are loc despiralizarea — detorsiunea și decondensarea cromonemelor, revenind la aspectul lor de cromoneme interfazice care se alungesc, se deformează, se încrucișează, permițînd veritabile anastomoze între ele. Se reconstituie un nucleu de tip reticulat.

Încă din anafază fragmentele de membrană nucleară, ce se prezintă sub formă de vezicule, migrează spre periferia fusului de diviziune. Numărul lor crește eventual printr-o sinteză suplimen-

tară, nouă, cu înaintarea spre telofază. Aceste vezicule se agregă în jurul masei cromozomale, se turtesc și înconjoară nucleul telofazic, formîndu-se astfel noua membrană nucleară pentru fiecare nucleu fiu. S-a constatat că în celula vegetală, în cursul anafazei, veziculele membranoase invadează substanța propriu-zisă a fusului de diviziune. Unele se deplasează spre masa cromozomilor de la cei doi poli opuși, pe cînd altele ajung la nivelul liniei de demarcație dintre cele două celule fiice. La microscopul electronic s-au evidențiat la nivelul cromozomilor aflați spre sfîrșitul diviziunii fibre tubulare ce țin de fus, avînd un diametru de 20—25 μm și care pornesc de la cromozomi spre regiunea centriolilor.

Tot în telofază are loc reorganizarea nucleolilor la nivelul regiunilor organizator nucleolar ale cromozomilor ce îndeplinesc funcția de organizatori nucleolari. Odată cu reorganizarea nucleilor fii și nașterea celulelor fiice, are loc și destrămarea aparatului mitotic. Cu trecerea spre interfază, structurile cromatiniene devin din ce în ce mai fine, iar matrixul cromozomal dispare.

Întreg ansamblul de fenomene care se desfășoară în mitoză duce la repartizarea în celulele fiice a cîte unui set complet de cromozomi. Repartizarea în fiecare celulă fiică a unui set complet de cromozomi, caracteristic speciei considerate, este posibilă deoarece încă înainte de diviziune, fiecare cromozom suferă un proces de dedublare, de duplicație. Din primul moment al mitozei, cromozomii apar dubli, fiecare prezentîndu-se sub forma a două cromatide paralele, dispuse foarte apropiat, cu excepția centromerului, care în acest stadiu rămîne nedivizat. Rezultă de aici că duplicarea materialului cromozomal are loc înainte de a fi inițiată diviziunea celulară. Restul mitozei nu va face altceva decît să asigure deplasarea celor două cromatide ce alcătuiesc fiecare cromozom spre polii opuși ai celulei în diviziune, cu alte cuvinte, repartizarea în celulele fiice a unei cantități egale de material genetic. Prin scindarea centromerului fiecărui cromozom la sfîrșitul metafazei se asigură separarea completă a fiecărui cromozom în două cromatide independente ce vor deveni cromozomi fii care migrează spre polii opuși ai fusului de diviziune. Separarea citoplasmei celulei mame în două celule fiice încheie procesul de apariție a două celule noi, identice cu celula inițială din care au provenit conținînd același număr de cromozomi. Din această cauză mitoza, diviziunea în general, trebuie privită ca un mecanism biologic fundamental, care asigură transmiterea informației genetice de-a lungul generațiilor celulare, în procesul de reproducere a celulei. Cînd aceste celule trec în interfază, cromozomii dispar, termen care este nefericit ales, deoarece metodele convenționale citologice nu ne permit să evidențiem

starea interfazică a cromozomilor, iar el devine și mai impropriu dacă considerăm că sînt grupe de organisme la care cromozomii își păstrează condensarea meta-anafazică și în interfază așa cum se întîlnește la alge dinoficee și euglenoficee. Și la eucariotele superioare, în interfază pot să rămînă regiuni din cromozomi care își păstrează matrixul și spiralizarea și care s-au numit cromocentri.

f. CITOCHINEZA

Diviziunile nucleare pot să nu fie urmate de citochineză, așa cum este cazul creșterii plasmodiale. Dar, de regulă, la celulele obișnuite, diviziunii nucleare îi urmează plasmodiereza sau citochineza. La plante se formează un nou perete celular din particulele reticulului endoplasmatic care migrează dinspre poli spre zona centrală, ecuatorială a figurii mitotice. Împreună cu elementele microtubulare, provenite probabil de la fusul de diviziune, dar putînd fi și sintetizate de novo, se formează o structură fibrilară, cu fibrele ordonate între seriile de cromozomi ce se deplasează spre poli. Această structură s-a numit fragmoplast, care crește între limitele fusului, între cromozomii ce migrează spre pol.

În jurul fibrelor microtubulare, la nivelul ecuatorului, pe locul unde s-a organizat placa metafazică, se aglomerează vezicule mici, sintetizate de aparatul Golgi și, eventual, de ribozomi. Veziculele se măresc, se contopesc, în contact cu suprafața celulei formîndu-se lamela mijlocie, care separă cele două celule fiice. Între celulele fiice rămîn legături citoplasmatice, numite plasmodesme, ce străpung peretele celular despărțitor. La animale, separarea celulelor fiice se realizează printr-un proces de strangulare, constricție mediană.

La celulele multinucleate, care se divid prin fisiune binară, se pare că nu este nici o legătură între diviziunile nucleilor și clivajul celulelor, așa cum se constată la protozoarul heliozoar Actinosphaerium eichornii și la opalinidul Opalina ranarum. La amoeba Pelomyxa, mitoza sincronă a nucleilor precede diviziunea corpului celular în două mase multinucleate dar nu apare vreo relație spațială între aparatul mitotic și fisiunea celulei.

În cazul diviziunii microsporocitelor în patru microspori, citochineza se realizează la fel ca la celula animală prin strangulare, iar uneori după tipul plasmodierezei celulei vegetale.

La organisme inferioare, bunăoară la drojdii, înmugurirea peretelui celular implică se pare acțiunea unei enzime, o disulfidreductază, asupra proteinelor peretelui celular la punctul unde va apare mugurele.

Poziția aparatului mitotic determină desfășurarea egală sau inegală a citochinezei. S-a constatat că dacă la Spirogyra, la care nucleul, în mod obișnuit, este suspendat la mijlocul celulei, are loc o deplasare a nucleului, se produce o diviziune inegală a citoplasmei. Prin experiențe de micromanipulare, Kawamura a stabilit că există o relație riguroasă între aparatul mitotic și planul citochinezei, acesta fiind în mod normal perpendicular pe ecuatorul fusului de diviziune.

S-a constatat că citochineza este condiționată de prezența auxinelor, pe cînd kinetinele influențează diviziunea nucleară.

În celulele normale, mitoza și citochineza sînt riguros coordonate în timp. Dacă diviziunea citoplasmatică este blocată, mitoza poate avea loc normal, producînd o celulă binucleată. La formarea a două celule fiice identice cu celula inițială intrată în diviziune, pe lîngă replicarea cromozomilor, are loc replicarea organitelor citoplasmatice, sau separarea acestora din celula mamă în celula fiică, urmînd ca acestea să-și completeze, prin noi sinteze, setul obișnuit de organite intracitoplasmatice. În metafază, mitocondriile se adună în jurul fusului. În anafază, cînd cromozomii fii se despart, toate mitocondriile celulei se grupează în jurul regiunii ecuatoriale, și odată cu separarea celulelor fiice are loc și repartizarea mitocondriilor în acestea. Reticulul endoplasmatic, la intrare în profază, este transformat într-un sistem discontinuu de vezicule sferice dispuse în special în regiunile periferice ale citoplasmei. În interfaza celulelor fiice, el revine la forma sa tipică.

Sînt unele date după care citochineza se poate realiza în absența cromozomilor, așa cum se întîmplă la ovulele de amfibieni, ovule de arici de mare sau de flagelate din genurile Trichonympha și Barbulanympha.

3. ENERGETICA DIVIZIUNII CELULARE

Fiind un proces dinamic, mitoza necesită pentru desfășurare o anumită cantitate de energie.

Celulele pot fi împiedicate să intre în diviziune dacă este blocată fosforilarea oxidativă. Dar dacă celula intrată deja în diviziune este supusă acțiunii inhibitorilor respirației și fosforilării oxidative, ea continuă să se dividă nestingherit. În perioada de diviziune, celula nu manifestă activitate respiratorie intensă. Nici oxidul de carbon nu influențează celula intrată deja în diviziune, dar are influență asupra celulei care se pregătește să intre în diviziune. De asemenea cantitatea de substanțe macroergice (ATP) crește brusc, tot înainte de intrarea celulei în diviziune.

Aceste date l-au determinat pe Makino (1968) să afirme că energia este stocată în aparatul mitotic, necesitățile energetice ale diviziunii fiind realizate înainte de diviziune în procese de creștere accelerată a volumului nuclear, a bazofiliei nucleului (amplificarea cantității de ARN) și a vîscozității citoplasmei care presupune procese de polimerizare ce stau la baza formării aparatului mitotic.

Diviziunea celulară este condiționată de un anumit regim chimic al celulei. La alga Chlorella, metabolismul sulfului joacă un rol important în diviziunea celulară. În condiții de carență a compușilor sulfului este diminuată sinteza ADN-ului și împiedicată diviziunea celulară. Același lucru se întîmplă în condiții de carență de compuși ai azotului. În timpul diviziunii s-a evidențiat creșterea cantității de compuși ai sulfului, solubili în acid tricloracetic. Asemenea compuși reprezintă complexe peptid-nucleotidice ce conțin cisteină, alți aminoacizi, adenină și uracil. Relația dintre metabolismul sulfului și diviziunea celulei algale a fost evidențiată și la Astasia sp. și Euglena sp. Adăugarea de aminoacizi ce conțin sulf în mediul de cultură în care creșteau amoebe a dus la reducerea duratei diviziunii.

Factori de mediu precum temperatura și lumina influențează desfășurarea diviziunii, aceștia fiind în mod curent folosiți în realizarea sincronizării culturilor de microorganisme.

În mod normal, represia diviziunii celulare este legată de diferențiere, căci tendința normală a celulei este de a se divide. Dar blocarea diviziunii poate să fie și rezultatul unor efecte hormonale sau imunologice, nutriționale etc. Este dovedit rolul sistemului endocrin în controlul diviziunii celulare la nimale. Bullough, Allen și Wiman au arătat că hormonii de tip androgen și oestrogen joacă un rol însemnat în diviziunea celulară. Sub acțiunea oestradiolului se desfășoară diviziuni foarte rapide în țesuturile de regenerare de la planarii.

După Altmann, în celulele pancreatice exocrine, mitoza se desfășoară într-un anumit stadiu al ciclului secretor iar Hirsch și Jacobs constată că periodicitatea mitozelor este legată de activitatea ritmică a glandei digestive la Astacus leptodactylus. Diviziunea celulară la animale este de asemenea desfășurată sub controlul sistemului nervos. Singer a constatat că la amfibieni, diviziunea în țesuturile de regenerare este dependentă de inervație.

Metabolismul și activitatea biosintetică a unei celule sînt maxime în interfază. Dar, începînd din profază, pînă în metafază — stadiul de contracție maximă a cromozomilor — această activitate este redusă la minimum.

La organismele aerobe diviziunea celulei este un proces dependent de oxigen. Datele lui Stern, par a admite că celula are nevoie de mai puțin oxigen pentru diviziunea propriu-zisă. Energia pentru diviziune poate fi însă procurată prin alte surse decît prin respirație, bunăoară prin glicoliză. Majoritatea celulelor au nevoie absolută de oxigen pentru inițierea diviziunii, dar diviziunea în sine sau cel puțin anumite stadii ale sale nu mai sînt legate de consum de oxigen, căci ele se desfășoară și în lipsa acestuia. Anumite substanțe precum oxidul de carbon (CO) nu mai pot influența diviziunea dacă acționează în timpul desfășurării sale, dar efectul lor tot se resimte, întîrziind desfășurarea următoarelor diviziuni. Apar însă și unele excepții. Se consideră că ATP intervine mai degrabă în funcția fusului decît în diviziunea cromozomilor și a celulei ca atare. Pentru diviziunea celulei sînt necesare grupări solubile de sulfhidril. Celula nu intră în diviziune pînă ce nu se atinge un anumit nivel al glutationului. Concentrația grupelor SH — este maximă în metafază. În meioză, ea se realizează pînă în zigoten de unde începe să scadă.

La Chlorella s-a constatat că dacă în lipsa fosforului, azotului sau potasiului, diviziunea se poate totuși realiza, în lipsa compușilor sulfului, ea nu poate avea loc.

Proteinele fusoriale conțin sulf și se apreciază că dizolvarea și formarea de legături bisulfidice influențează starea gel-sol a componentelor fusului și prin aceasta formarea însăși a fusului. Grupările sulfitice influențează diviziunea celulară pe căi multiple, fiind implicate în starea morfologică a cromozomilor și fusului, în potențialul redox ca și în consumul de energie al celulei.

B. TIPURI PARTICULARE DE DIVIZIUNE NUCLEARĂ

În afara mitozei tipice, în lumea vie se întîlnesc numeroase tipuri de diviziune nucleară începînd de la amitoză sau diviziune directă, pînă la complicatele mecanisme mitotice de diviziune, ce caracterizează în special grupele inferioare de organisme. Indiferent care este modelul de desfășurare a diviziunii nucleare se ajunge în final la nașterea a doi nuclei fii care vor deveni nucleii celulelor fiice. Nu există o diferență fundamentală între diferitele tipuri de mitoză. Rostul lor este același: continuarea liniilor celulare, repartizarea în celulele fiice a aceleiași informații genetice care a fost în celula mamă.

1. AMITOZA

În cazul *amitozei* are loc împărțirea nucleului în două părți mai mult sau mai puțin egale, printr-o constricție mediană. Amitoza caracterizează în special celule diferențiate precum celulele haploide, cu excepția macro și microsporilor, diferite celule conjunctive de nevertebrate, leucocite ca și celulele aflate în condiții improprii de cultură cum ar fi cazul culturilor vechi de Euglena gracilis și alte organisme. Și celulele epiteliului uterin se pot divide amitotic. Celulele rezultate din diviziuni amitotice sînt deplin viabile și pot suferi procese obișnuite de diferențiere.

2. PLEUROMITOZA, CRIPTOMITOZA, CRIPTOPLEUROMITOZA

În afara tipului normal, de mitoză, pe care l-am descris anterior și care poartă denumirea de ortomitoză, mai există și tipuri particulare de mitoză precum pleuromitoza, criptomitoza, criptopleuromitoza etc. Caracteristica lor generală este individualizarea cromozomilor și prezența unor mecanisme specifice de repartizare a lor în celulele fiice. Denumirea de mitoză vine de la grecescul *mitos* care înseamnă „fir", definind individualizarea de cromozomi în cursul desfășurării sale. Prin contrast, amitoza înseamnă desfășurarea diviziunii fără individualizare aparentă de cromozomi și fără formarea fusului acromatic.

În cazul *ortomitozei* are loc fixarea centromerilor de fibrele fusoriale și formarea plăcii ecuatoriale, metafazice. Acest tip de diviziune care caracterizează unele protozoare, crisomanodinele, metazoarele și metafitele, precum și unele microfite, se desfășoară cu sau fără centrozomi.

În cazul pleuromitozei nu se formează placă ecuatorială, cromozomii fiind vizibili spiralizați în toate fazele mitozei cu excepția anafazei, cînd are loc dedublarea cromatidelor.

În cazul pleuromitozei are loc inserția centromerilor pe membrana nucleară, din care cauză fusul este foarte dezvoltat și intim alipit de membrana nucleară. În general, la protozoare, ca și la alte organisme inferioare, membrana nucleară persistă în cursul cariochinezei. Din această cauză, diviziunea nucleului poartă denumirea de criptomitoză. Centrii chinetici și fusul au o localizare extra sau intranucleară, iar segregarea cromatidelor este sau nu riguros sincronizată cu segregarea centrilor chinetici.

În pleuromitoză, fusul este foarte dezvoltat, intim asociat cu nucleul, neintervenind însă în separarea cromatidelor fiice care este „regizată" în întregime de centromeri. După dedublarea centromerilor, cromatidele fiice alunecă pe membrana internă a nucleului spre polii opuși ai săi. Rolul dinamic în pleuromitoză este îndeplinit de centromeri, pe cînd în ortomitoză de centrozom și de fus. În funcție de localizarea centrilor mitotici și după sincronizarea segregării cromatidelor și a centrilor cinetici, Hollande A. (1972) deosebește patru tipuri fundamentale de criptomitoză:

— criptomitoză cu fus extranuclear (criptopleuromitoză) (Fig. 76);
— criptomitoză cu semifusuri dependente de centrii cinetici intranucleari (Fig. 77, A);
— criptomitoză cu semifusuri ce depind de centrii cinetici extracelulari (Fig. 77, B, C);
— criptomitoză de tipul mitozei clasice de la metazoare, dar cu aria nucleară parțial limitată de membrana nucleară.

În cazul criptopleuromitozei, se remarcă localizarea intracitoplasmatică a fusului, pe cînd fibrele cromozomale sînt ansamblate în fascicule independente de cele ale fibrelor continui. Centromerii sînt asociați membranei nucleare. Lipsește o placă ecuatorială (metafazică). Segregarea cromatidelor se realizează prin jocul antagonist al fibrelor cromozomale și al fibrelor continui. În final are loc migrarea a două loturi de cromatide la polii opuși ai fusului, urmată de neoformarea materialului nucleomembranos.

Iată cum descrie A. Hollande (1972) criptopleuromitoza la o Hypermastigină Pseudotrichonympha, de 180 μm lungime: „diviziunea debutează prin fisurarea rostrului în două jumătăți. Din regiunea rostrală se formează două baghete de natură centriolară, două tije atractofore, care se alungesc în direcția nucleului. La capetele acestor tije ia naștere cîte o sferă de archeplasmă. Concomitent cu alungirea atractoforilor are loc formarea fusului ce este inițiată la nivelul zonelor de archeplasmă (citoplasma omogenă) de la care pornesc fibre asteriene (filamente) ce iradiază în citoplasmă în toate direcțiile. Fibrele de la nivelul sferelor opuse se unesc vîrf cu vîrf rezultînd un fus cu fibre continui. Fusul se alungește progresiv, întîlnindu-se cu nucleul pe care se așează în momentul cînd cromatidele se despart. Fibrele cromozomale ating primele membrana nucleară. Nucleolul se deformează. Fusul se înfundă în nucleu, în care, în cele din urmă, pătrunde. Fibrele cromozomale se prind de centromeri și prin contracție se scurtează grupînd cromatidele în jurul sferelor de arhoplasmă (Fig. 78). Iau naștere astfel două loturi de cromozomi care se spiralizează foarte intens. Pe cînd

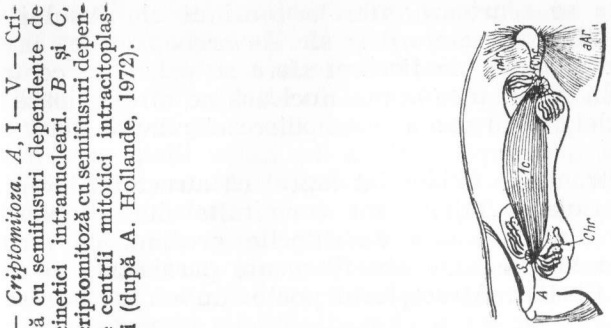
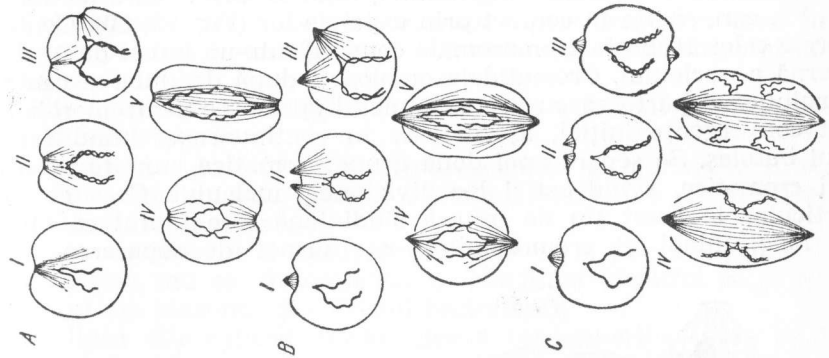


Fig. 78 — *Sfîrșitul diviziunii la Barbulanympha ufalula* (după A. Hollande, 1972). *A* — atractofor; aAr — aree veche; chr — cromozom; fchr — fibre cromozomale; fc — fibre fusoriale continui; nAr — aree nouă; *S* — sferă archeplasmică.

Fig. 77 — *Criptomitoza. A*, I — V — Criptomitoză cu semifusuri dependente de centri cinetici intranucleari. *B* și *C*, I—V — criptomitoză cu semifusuri dependente de centrii mitotici intracitoplasmatici (după A. Hollande, 1972).



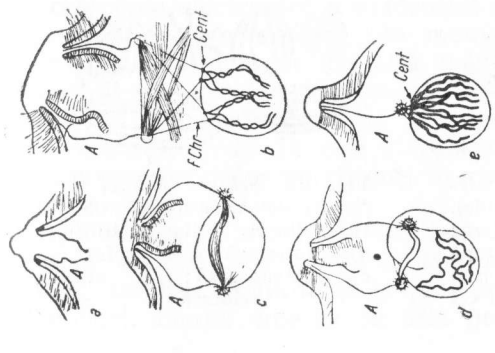


Fig. 76 — *Schema criptopleuromitozei la Pseudotrichonympha* (după **A. Hollande 1972**). *a.* Începutul neoformării atractoforilor la a căror extremitate apicală se condensează archeplasma; *b.* prometafază; *c* și *d* — anafază; *e* — individ postelofazic cu atractofor neînvoluat încă; centromerii sînt asociați cu sfera archeplasmică prin fibre cromozomale scurte; *A* — atractofor; Cent — centromer, FChr — fibre cromozomale

fibrele cromozomale se scurtează, fibrele continui ale fusului se alungesc. În același timp atractoforii și sferele archeplasmice involuează. Fibrele cromozomale ale fiecărei sfere se prind de centromere neomoloage. În final, membrana nucleară se strangulează și iau naștere doi nuclei fii. În urma plasmodierezei rezultă două celule flagelate".

Microscopia electronică a evidențiat faptul că atractoforii reprezintă organite centriolare. Tijele sînt constituite din citoplasmă electronodensă sau din bastonașe de diferite grosimi, cu structură periodică, fuzionate în lame sau filamente parabazale la care se adaugă material fibrilar. Atractoforul poate sau nu să regreseze în celula fiică.

Tot un tip particular de mitoză a fost și acela pe care l-am descris în cadrul organizării mezocariote, la Dinophyceae. La Syndinium turbo este o mitoză denumită sindiniană în care apar 5 cromozomi, care clivează longitudinal, dînd 10 brațe, care au formă de „V", care rămîn în contact prin capetele lor (Fig. 79, 80). Centromerele celor 10 brațe cromozomale converg într-un punct de pe fața internă a nucleului. Cromatidele omoloage, după dedublarea centromerului se depărtează cu 90° de punctul spre care centromerele au fost convergente inițial, așezîndu-se în continuare și luînd forma unui butoiaș. Se separă apoi două grupe cromatice, numite semifusuri cromatice, avînd astfel loc diviziunea nucleului. Ceea ce este particular la acest tip de mitoză sindiniană este faptul că clivajul longitudinal al cromozomilor este urmat de separarea altor

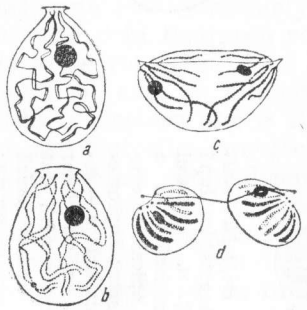


Fig. 79 — *Cariochineza la Merodinium belari* (Syndinide). *a, b* — prometafază și metafază; *c* — anafază; *d* — telofază (după A. Hollande, 1972) (în fig. *a* și *b* sînt reprezentați doar 2 din cei 5 cromozomi.

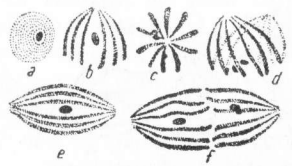


Fig. 80. *Schema mitozei la Syndinium turbo* (după Chatton, din A. Hollande, 1972). *a* — interfază; *b* — profază; *c* — metaanafază; *e, f* — anatelofază.

două jumătăți ce simulează numai o sciziune transversală, cromozomii avînd formă de V cu două ramuri foarte apropiate, după mișcarea de răsturnare a celor două cromatide rezultate din clivaj.

Grassé (1952) admite că la aceste Peridinee, cromozomii au centromerii fixați pe membrana nucleară. După clivaj, cromatidele merg spre polii opuși ai nucleului printr-o simplă alunecare a centromerilor pe fața internă a membranei nucleare. Dar în lipsa fusului de diviziune „clasic" este greu de apreciat dacă există sau nu centromeri la dinoflagelate Peridinee.

Așa după cum s-a mai arătat, dinoflagelatele întrunesc unele caracteristici intermediare între procariote și eucariote. Este interesant de remarcat similitudinea în unele privințe nu numai în ceea ce privește organizarea genetică moleculară sau supramoleculară a bacteriilor și dinoflagelatelor, dar și între modalitățile de îndepărtare a genoforilor bacterieni fii și distribuția lor în celulele fiice și mecanismul segregării și repartizării cromatidelor în nucleii fii la dinoflagelate, dar la bacterii este un raport cromozom-membrană celulară, pe cînd la dinoflagelate există un raport cromozomi-membrană nucleară.

Alte caractere morfologice și biochimice care sînt proprii acestui grup de flagelate sînt:

— păstrarea individualității cromozomilor pe parcursul întregului ciclu mitotic, stadiul de interchineză nefiind din această cauză o interfază;
— neasocierea ADN-ului cu histonele ca și la cromozomul bacterian sau cel mitocondrial și plastidial (dealtfel ca și ADN-ul din plasmide și episomii bacterieni);
— lipsa diferențierii morfologice a centromerilor, ceea ce face ca în urma iradierii cu raze X de 4000—5000 V să apară fragmente de cromozomi dar care pot să segrege normal în nucleele fiice.

Microscopia electronică a evidențiat pe de o parte prezența unor plasmodendrite, perforațiuni ale membranei nucleare în care se află microtubuli, iar, pe de altă parte, absența centromerilor la cromozomii de dinoficee, cromozomii prinzîndu-se de membrana nucleară nu prin centromeri, ci prin telomere (capetele specializate ale cromozomilor). Și la alte flagelate s-a evidențiat prezența în nucleu a cromozomilor persistenți în stadiul condensat pe parcursul întregului ciclu mitotic.

Criptomitoza cu semifus dependent de centri cinetici intranucleari a fost descrisă de Robinow și Marak la Ascomycete, pentru prima dată, dar este întîlnită și la protozoare cum ar fi Foraminifere și Radiolari. Centri cinetici se află pe fața internă a membranei

nucleare ; are loc asocierea timpurie a acestor centri cinetici cu centromerii celor două loturi de cromatide prin atingerea fibrelor cromozomale grupate în semifusuri și formarea ulterioară a unui fascicol de fibre continui prin alungirea căruia se separă două nuclee fiice.

La Sporozoare, Gregarine și Coccide s-a descris o cariorchineză de tip mitotic cu fus normal, alcătuit din fibre cromozomale și fibre continui. Este de fapt o diviziune care reunește caracteristici de criptomitoză și ortomitoză, din care cauză s-a numit criptoortomitoză.

În cazul criptoortomitozei, fusul este de tip clasic și este caracteristică formarea plăcii ecuatoriale intranucleare.

Toate tipurile de diviziune pe care le descriu diverși autori la grupele inferioare de animale, în special la Protozoare (vezi Grassé P. P., 1952), se încadrează în aceste tipuri fundamentale de diviziune cariochinetică și prezintă o desfășurare mai mult sau mai puțin particulară.

3. MITOZA EUGLENOIDĂ

Nici un grup de vieţuitoare nu a fost atît de asiduu cercetat ca Euglenophyta, în ceea ce privește diviziunea nucleară. În același timp, nici un grup de vieţuitoare nu a generat atîtea controverse în ceea ce privește diviziunea sa nucleară. Gama tipurilor de diviziune nucleară descrise la Euglenoficee începe de la amitoză și ajunge la mitoză tipică. În clasificarea diviziunii euglenoide, un rol esențial l-au avut cercetările lui P. A. Dangéard, la începutul secolului al XX-lea și, ulterior, ale lui A. Hollande (1952) și mai ales ale lui G. F. Leedale (1966, 1967). Dar Leedale a respins posibilitatea existenței și a altor tipuri de diviziune euglenoidă în cadrul acestui grup destul de heteromorf, considerînd că asemenea tipuri particulare de diviziune la euglenoficee nu sînt legate de reproducere.

Cercetările noastre (L. Gavrilă, 1973) efectuate la mai multe populații, aparținînd diferitelor specii de Euglena, au evidențiat, pe lîngă mecanismul tipic de mitoză euglenoidă, pe care l-am întîlnit la Euglena clara, și tipuri particulare de diviziune în care nucleul ia forma de potcoavă, la nivelul căreia se individualizează cromozomi care se vor distribui mai mult sau mai puțin uniform în celulă. Prin sciziune longitudinală sau prin înmugurire iau naștere două celule cu număr de cromozomi mai mult sau mai puțin echilibrat. Acest tip de diviziune l-am întîlnit la Euglena terricola (L. Gavrilă, 1973).

La Euglena clara, diviziunea se desfășoară după tipul clasic al haplomitozei, descris de către P. A. Dangéard, A. Hollande și G. F. Leedale.

Nucleul de E. clara prezintă un nucleol central, numit cariozom sau endozom (Fig. 81 a). În interfază, de jur împrejurul său se află granule de cromatină, ce reprezintă cromozomii care nu-și pierd total integritatea. Acești cromozomi interfazici au orientare regulată în serii liniare, dînd aspectul unui filament moniliform, înfășurat ca un ghem în jurul nucleolului. Cu progresarea în diviziune, nucleolul se alungește perpendicular pe axa mare a celulei, nucleul devenind din ce în ce mai mare și eliptic. Se individualizează cromozomii lungi, cu aspect moniliform care, într-un stadiu considerat drept metafază, devin paraleli în jurul axei nucleolare, formînd ca un manșon cilindric, omologat cu placa ecuatorială dar care se deosebește radical de aceasta căci cromozomii, în așezarea lor, formează o succesiune de planuri paralele la axa de diviziune. Are loc clivajul longitudinal al cromozomilor, care duce la naşterea a două cromatide înfășurate una față de cealaltă. Printr-o mișcare de alunecare, efectuată în sens opus cromatidele fiice, se separă în două grupuri anafazice. La poli, ajung cromozomii fii ce înconjoară capetele umflate ale nucleolului alungit. Prin întinderea nucleolului el se rupe la mijloc. Se separă astfel două nuclee fiice în care fiecare nucleol fiu se rotunjește progresiv (Fig. 81, e, f).

Diviziunea nucleară la Euglena clara este o formă particulară de mitoză (Fig. 81, a-g) în care nu există fus de diviziune dar în care se individualizează cromozomi care prezintă stadii diferite de diferențiere.

La Hyalophacus ocellatus, Leedale (1962) a descris anumite aspecte particulare ale nucleului pe care le-a considerat stadii meiotice. Procesul sexual tipic nu a fost însă cert evidențiat la euglenoficee, așa încît asemenea aspecte meiotice ar putea fi cel mult urmarea autogamiei.

Diviziunea euglenoidă îndeplinește criteriile esențiale ale mitozei prin aceea că se individualizează cromozomi, ce se duplică longitudinal în cromatide surori, care segregă în nuclei-fii diferiți. Diviziunea euglenoidă este un proces mitotic particular în care persistă endozomul (nucleolul), care conține ARN, lipsește fusul de diviziune și centromerii. În cadrul ei are loc dispunerea paralelă a cromozomilor la axa de diviziune, în metafază, dar lipsește o placă ecuatorială adevărată. De asemenea separarea cromatidelor, segregarea și migrarea anafazică sînt procese de lungă durată. Între diviziunea tipic euglenoidă de la Euglena clara și aceea de la Peridinium tabulatum sînt multe asemănări aparente. Deosebirea

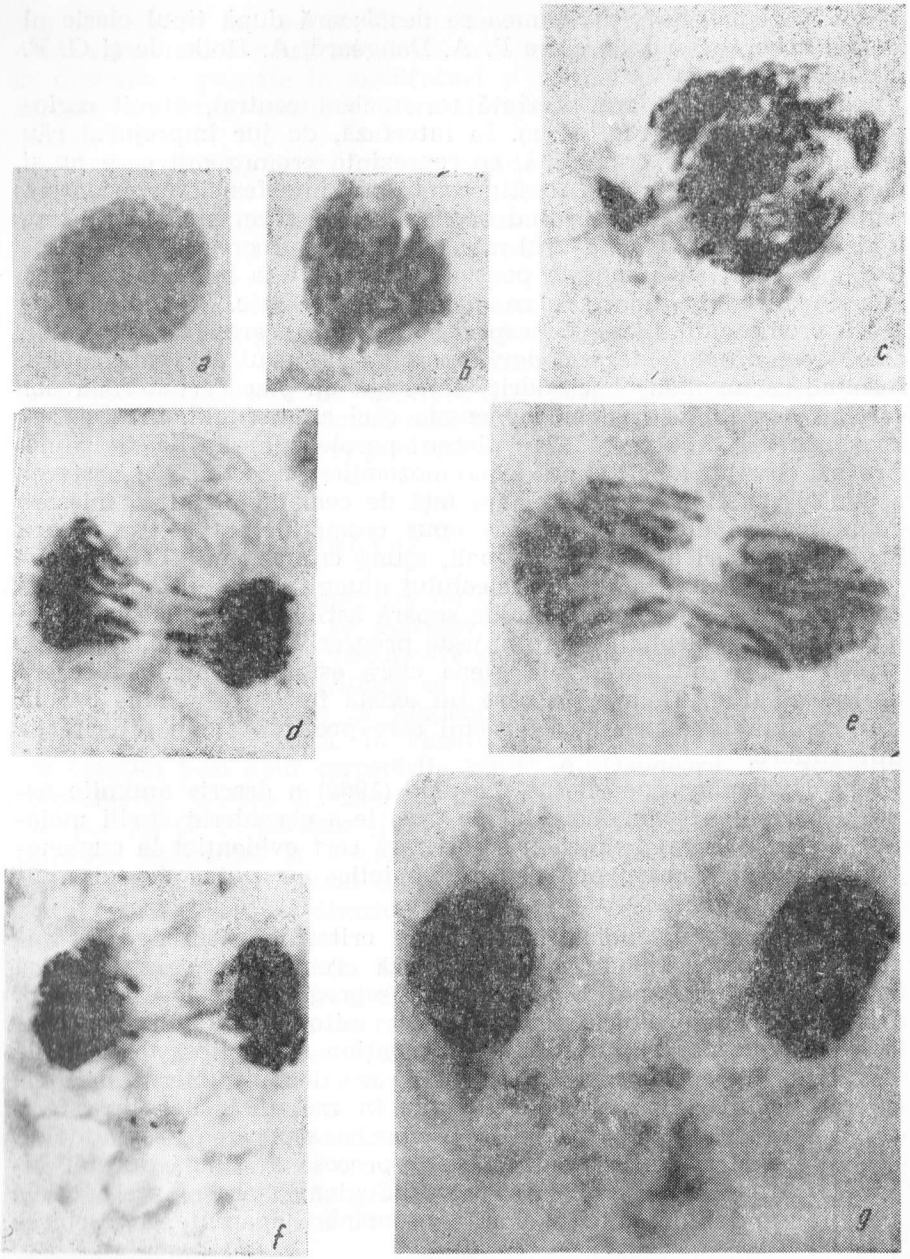


Fig. 81 — *Mitoza euglenoidă la Euglena clara* (original). *a* — nucleu interfazic cu cariozom (endozom) central; *b* — profază; *c* — metafază; *d, e* — anafază; *f* — telofază; *g* — sfîrșitul diviziunii nucleare, începutul citochinezei.

dintre Dinoficee și Euglenoficee apare la nivelul organizării supramoleculare a materialului genetic. Dacă la marea majoritate a Dinoficeelor, ADN-ul nu este asociat cu proteinele bazice-histonice, la Euglenophyceae, organizarea este tipic eucariotă, demonstrîndu-se printre altele asocierea permanentă a ADN-ului cu histonele (M. S. Netrawali, 1970).

4. DIVIZIUNEA NUCLEARĂ LA CILIATE

La ciliate, în endoplasmă, se află două tipuri de nuclee: macronucleul și micronucleul. Macronucleul este legat de activitățile metabolice pe cînd micronucleul este legat de reproducerea sexuată și asexuată. Macronucleul se divide prin amitoză, pe cînd micronucleul se divide prin cariochineză de tip mitotic. În timpul conjugării, indivizii fuzionează prin puntea protoplasmatică. Macronucleul se dezintegrează. Fiecare micronucleu se divide de două ori, formîndu-se patru nuclei, din care trei se dezintegrează. Micronucleul rămas se divide spre a da în fiecare conjugant cîte 2 nuclee. Dintre aceștia, cîte unul migrează în partenerul opus și se unește cu micronucleul care nu a migrat. Rezultă în fiecare partener conjugat, care se separă, cîte un nucleu numit heterocarion, căci el provine din unirea a doi micronuclei ce aparțin la indivizi diferiți. Acest nucleu se divide de trei ori spre a da 4 micronuclei (din care trei degenerează) și 4 macronuclei. Are loc diviziunea indivizilor exconjuganți în același timp cu diviziunea micronucleului. Prin două diviziuni succesive rezultă cîte patru indivizi noi, fiecare cu cîte un micronucleu și macronucleu. Indivizii rezultați au o constituție genetică reorganizată.

Macronucleul se divide amitotic (Fig. 82). Diviziunea macronucleului la Ciliate reprezintă un bun exemplu pentru a demonstra că de fapt amitoza nu este un proces atît de simplu cît se pare la o analiză superficială.

La ciliatul Chlamydodon pedarius, în interfază, macronucleul are formă elipsoidă. Partea anterioară are structură veziculară, iar partea posterioară o structură masivă. În centru se află un nucleol masiv (endozom). Diviziunea începe cu dezintegrarea părții frontale a nucleului. Materialul nuclear apare organizat la nivelul unor cromonemate (filamente spirale-cromoneme). În partea mediană a macronucleului apare o formațiune numită banda de reorganizare. Endozomul se fragmentează în mici granule sau filamente. Cromonemata ar reprezenta organizarea materialului genetic ce amintește organizarea cromozomală. Spre sfîrșitul diviziunii, cromonemata ca-

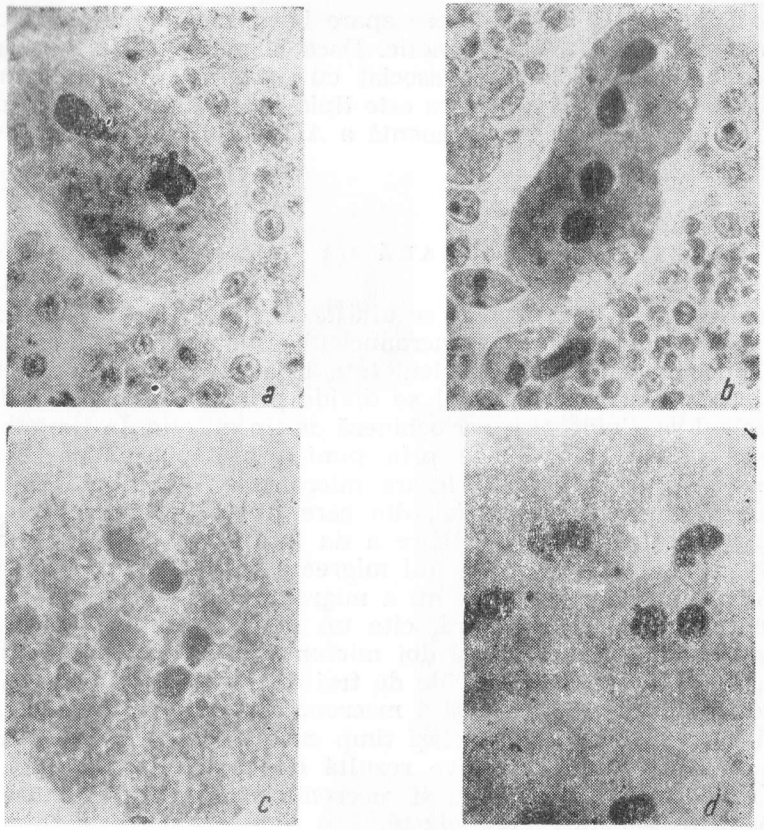


Fig. 82 — *Aspecte ale diviziunii macronucleului la ciliate* (original).

pătă un aspect paralel, orientîndu-se pe axa longitudinală a nucleului. Cromonemata se separă în două grupe. O constricţie ecuatorială la nivelul benzii de reorganizare duce la scindarea macronucleului în două părţi. În nucleele fiice, cromonemata îşi pierde treptat individualitatea.

Macronucleul de ciliate este poliploid, cromonemata din el prezentînd asemănări cu cromozomii observaţi de Geitler în endomitozele nucleilor din organe variate de la Heteroptera.

Urmărind sinteza ARN-ului şi proteinelor în macronuclei de Euplotes, Prescott a stabilit că ciclul celular la acestea nu prezintă o perioadă G_2 măsurabilă iar sinteza ADN-ului, realizată în faza S,

se desfăşoară numai la nivelul a două benzi înguste de replicaţie. Sinteza ARN-ului are loc în timpul G_1 şi continuă în timpul diviziunii amitotice. ADN-ul angajat în replicaţie este incapabil să suporte sinteza ARN-ului.

În general, la protozoarele ciliate, micronucleul mic se divide mitotic, pe cînd macronucleul se divide amitotic. Dar macronucleul care prezintă nucleoli distincţi, prezintă şi o sinteză activă de ARN. Iniţial în dezvoltarea macronucleului, aşa cum s-a observat la Stylonychia mytilus, se formează cromozomi politeni, care apoi se dispersează formînd un număr foarte mare de granule de cromatină. Macronucleul de Euplotes are formă de filament lung, iar în interfază suferă o reorganizare profundă, în care are loc apariţia a două zone clare transversale, care s-au numit benzi de reorganizare. La început ele sînt plasate la capetele macronucleului după care se deplasează central, fuzionează şi dispar cu puţin timp înainte de începerea diviziunii amitotice prin constricţia mediană a macronucleului. Benzile de reorganizare sînt zone de intensă sinteză de ADN şi de histone. Cantitatea de ADN din macronucleu este de 100 de ori mai mare decît în micronucleu. Organizarea cromatinei macronucleului este granulară. El conţine şi numeroşi nucleoli. Diviziunea amitotică nu repartizează echilibrat ADN-ul în nucleii fii la Tetrahymena pyriformis, din care cauză, ori se elimină ADN-ul suplimentar, ori va avea loc o replicaţie suplimentară de ADN care să compenseze lipsa acestuia din unul din macronucleii fii.

La Paramecium şi Tetrahymena, genele micronucleului nu sînt exprimate, de vreme ce unele suşe pot supravieţui nedefinit în absenţa completă a micronucleului. Este interesant că cel puţin un fragment din macronucleu (de ex. 1/40) este capabil să regenereze întreg macronucleul, fiind absolut necesar pentru supravieţuirea celulei. Aceasta înseamnă că macronucleul conţine multiple copii ale complementului cromozomal de bază fiind caracterizat de politenie (conţine de 50—100 ori mai mult ADN decît micronucleul care este diploid). Şi proteinele histonice prezintă fracţiuni diferite în micronucleu faţă de macronucleu, o singură fracţiune histonică fiind comună. În macronucleu se află histone asemănătoare celor bogate în lizină de la organismele superioare. (Du Praw, 1970).

În ciclul sexual, macronucleul se dezintegrează, micronucleul se divide şi unul din micronucleii fii devine macronucleu prin apariţia de modificări biochimice mai ales în ceea ce priveşte histonele. Micronucleul are o membrană nucleară fără pori pe cînd membrana nucleară a macronucleului are numeroşi pori. Macronucleul conţine cîteva sute de nucleoli mici şi este foarte activ în sinteza ARN-

ului. Micronucleul se divide prin mitoză, la nivelul său apărînd un aparat microtubular ale cărui proteine sînt sintetizate în citoplasmă și pătrund în micronucleu prin mecanisme care nu sînt dependente de porii membranei nucleare.

În macronucleul de Euplotes s-au putut estima 11.000—23.000 de sferoizi de 0,1—1,2μm diametru care reprezintă unități ale cromatinei numite granule de cromatină. În micronucleu se află un set diploid de 8 cromozomi, se consideră că granulele de cromatină sînt fragmente de cromozomi conținînd circa 1/25 din ADN-ul unui cromozom.

La Paramecium și Tetrahymena aceste granule de cromatină sînt interconectate de fibrile de 100 Å diametru formînd o rețea neliniară.

La Euplotes, macronucleul are forma unei benzi (panglice) de 140 μm lungime și 8 μm lățime. Diviziunea sa este precedată de un proces de replicare a ADN-ului ce se desfășoară la nivelul a două „benzi de reorganizare" transversale care apar inițial la capetele opuse ale nucleului pentru ca apoi să se deplaseze secvențial una spre cealaltă pînă se întîlnesc la mijloc și întîlnirea se realizează după 8—10 ore. Fiecare bandă are o regiune anterioară și alta posterioară. În porțiunea anterioară se află fibre de cromatină de 140—180 Å diametru. În regiunea posterioară, acolo unde are loc sinteza ADN aceste fibre au 30—40 Å diametru. În spatele benzii de reorganizare, în deplasare, ADN-ul se constituie din nou sub forma de granule de cromatină. Benzile de reorganizare reprezintă regiuni de activitate a ADN-polimerazei, în care cromatidele, strîns împachetate, posibil superspiralizate, devin despiralizate, lungi, funcționînd ca matriță în timpul replicației. La Aspidisca, benzile de reorganizare apar inițial la centrul macronucleului, deplasîndu-se secvențial spre capetele lui.

La Urostyla grandis sînt mai multe macronuclee, fiecare avînd cîte o singură bandă de reorganizare care se mișcă secvențial de la un capăt la celălalt al macronucleului. Se pare că în micronucleu are loc un proces meiotic cu formare de bivalenți.

Se constată că la Stylonychia mytilus se află în cromozomii politeni un număr mare de pufe, mai multe chiar decît la cromozomii uriași de la diptere.

În afară de prezența ADN-ului la nivelul micro și macronucleului, la ciliatul Tetrahymena s-a pus în evidență prezența unui ADN la nivelul corpului bazal fiind un ADN centriolar aflat în cantitate de 2.10^{-16} grame, reprezentînd echivalența unui filament de ADN dublu helicoidal de 61 μm lungime (Du Praw, 1970).

5. ENDOMITOZA ȘI POLITENIA

Endomitoza este fenomenul de multiplicare a numărului de cromozomi fără ca această multiplicare să se realizeze în condițiile diviziunii celulare. Endomitoza apare în urma replicărilor succesive ale cromozomilor fără ca produșii de replicație să fie repartizați în doi nuclei fii, ajungîndu-se la nașterea de nuclee endoploide. Ulterior are loc disocierea, separarea în cromatide, a acestor cromozomi politeni (formați din n cromatide) cromatide care se spiralizează individual devenind cromozomi, multiplicîndu-se de „n" ori numărul inițial de cromozomi.

La diptere, numărul de celule în țesuturile larvare este fix. Nici o diviziune nu mai are loc după formarea organelor. Dar celulele cresc prin procese endomitotice în timpul cărora cromozomii se replică de 8, 9 sau 10 ori, devenind cromozomi politenici giganți. Deși numărul de cromozomi rămîne același, cantitatea de ADN per cromozom crește în proporție geometrică. Sistemul politenic apare ca un rezultat al diviziunilor endomitotice succesive în care produșii de replicație spre deosebire de endomitoza tipică rămîn împreună. Sistemul politenic este însoțit de reținerea perechilor somatice de cromozomii rezultați din cromatide omoloage, care vor forma un singur cromozom. Din apariția zonelor cromatice și acromatice rezultă sistemul de benzi caracteristic cromozomilor uriași. Benzile își pot începe replicația ADN-ului lor simultan.

S-a remarcat că uneroi, în același organ (ganglionii cerebroizi de la Drosophila hydei) se află atît celule politene, cît și celule normale diploide.

Endomitoza caracterizează deopotrivă grupele inferioare și superioare de organisme nevertebrate (radiolari, infuzori, crustacei, unele grupe de heteroptere, dipterele) precum și unele plante.

În urma a 8 replicări succesive ale cromozomilor, garnitura de cromozomi la hemipterul Gerris ajunge la 256. Fenomene endomitotice au fost descrise de către Geitler la numeroase nevertebrate, mai ales în glandele salivare. Endomitoza apare de asemenea în celulele glandelor digestive de la crustaceul isopod Anilocra physodes, ca și în glandele sale salivare. White (1972) a arătat că la Cecidomyiidae (Itonididae), endomitoza apare fie ca rezultat al endopoliploidiei, fie ca rezeultat al politeniei, chiar la aceeași glandă salivară.

Reproducerea cromonemală interfazică sau endoreduplicația sînt mecanisme ale poliploidizării celulare (endopoliploidie). Și la vertebrate, în celulele hepatice au fost descrise fenomene endomito-

tice. Încercînd să explice semnificaţia endomitozei, Geitler consideră că aceasta creează mai puţine dereglări funcţionale decît mitoza.

În endomitoză, cromozomii se comportă normal pînă la sfîrşitul profazei cînd nu se remarcă dispariţia membranei nucleare şi apariţia fusului de diviziune, dar cromatidele se separă şi se spiralizează independent. Ca rezultat apare endopoliploidia (multiplicarea numărului de cromozomi, (Fig. 83). În condiţii de culturi celulare, în care se află celule leucemice, cu ascite tumorale sau celule iradiate, apare o formă de poliploidizare în care se formează duplocromozomi în profază şi metafază. Aceasta s-a numit endoreduplicaţie. Dacă în endomitoză, replicarea cromozomilor se desfăşoară normal, dar este dereglată, separarea lor datorită abolirii procesului mitotic, în endoreduplicaţie multiplicarea cromozomilor are loc în interfază. Ambele procese au însă, în final, acelaşi rezultat. După Schreiber, care a remarcat creşterea numărului de organizatori nucleolari ca urmare a endomitozei, endoploidia sau politenia reprezintă una din cele două căi posibile de creştere, în celulă, a cantităţii de material direct legat de sinteza intracelulară proteică. O altă cale ar fi multiplicarea organizatorilor nucleolari fără o multiplicare concomitentă a întregului genom. În endomitoza numită mitoză meristică are loc separarea cromozomilor politeni în cromatide spiralizate independent.

Politenia este fenomenul de replicare succesivă a cromozomilor fără a avea loc separarea cromatidelor. Rezultă astfel un cromozom politen (polis = numeros; tenos = filament) numit cromozom uriaş sau gigant, alcătuit dintr-un număr mare de cromatide şi care este cunoscut îndeobşte în glandele salivare de la diptere.

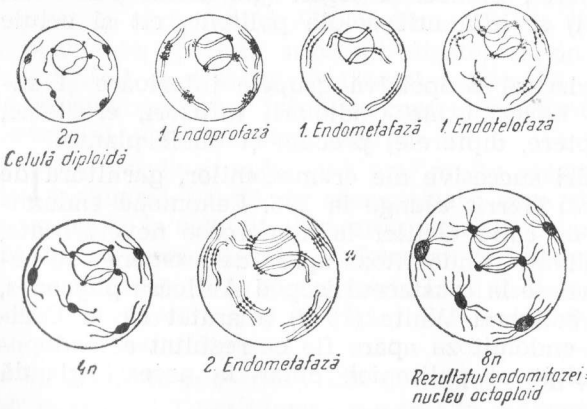


Fig. 83 — *Schema endomitozei* într-un nucleu cu procromozomi la o angiospermă. Se evidenţiază clar cromocentrele pe cînd regiunile eucromatice sînt reprezentate cu linie subţire (după Grundmann, 1973).

Dacă un cromozom obişnuit are o lungime de 0,5 — pînă la circa 30 μm şi două cromatide, cromozomul gigant, politen, de la Drosophila, are 256 cromatide şi o lungime de 1180 μm (lungimea însumată a celor 6 braţe ale sale). Are loc şi o multiplicare a numărului cromonemelor, ajungînd de exemplu la Chironomus la 16.000—32.000. Cromozomul politen apare ca o succesiune de discuri, care pot fi mai mult sau mai puţin Feulgen-pozitive. Porţiunile Feulgen-pozitive. reprezintă zone în care cromomerele omoloage sînt aşezate una lîngă alta, la acelaşi nivel. Cînd, în anumite stadii ale dezvoltării larvare, asemenea discuri Feulgen-pozitive cresc apreciabil, ele apar ca structuri particulare care au fost denumite pufe sau inele Balbiani, reprezentînd zone de intensă sinteză de acizi nucleici (Fig. 84).

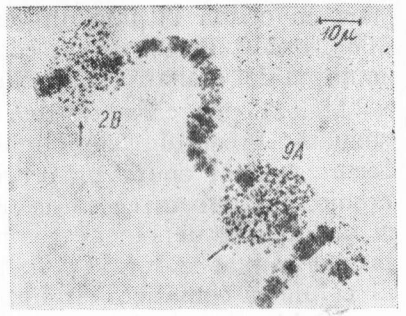


Fig. 84 — *Cromozomul II de Sciara coprophila* după 15 minute de la incubarea cu ^{3}H-TdR şi la care pufele se află la maximum de extensie, demonstrînd o intensă sinteză de acizi nucleici (după Gabrusewycz-Garcia, 1964, din B. John şi K. R. Lewis, 1969). (x 1080).

Fenomene de endoploidie şi politenie au fost remarcate şi la plante, (la Rhinanthus alectorolophus, E. Tschermak-Woess a evidenţiat cromozomi politeni în celulele endospermului) în celulele mari epidermice de la unele monocotiledonate şi la unele plante suculente, în peri epidermici, trichome, în celulele tapetale ale anterelor, în celulele antipodiale ale sacului embrionar etc. Aceste fenomene sînt legate de procese de diferenţiere specifică (citodiferenţiere), pe de o parte, şi de procese funcţionale prin care se asigură sinteza unor mari cantităţi de proteină într-o perioadă relativ scurtă de timp (Stebbins, 1971). Aceste celule caracterizate prin endoploidie şi politenie au multiplicate genele capabile de a transcrie ARN, ca şi regiunile organizator nucleolar, care transcriu ARN-r, în mai multe copii şi au posibilitatea să formeze un număr mult mai mare de complexe poliribozomale decît celulele diploide.

C. MEIOZA

Denumirea de meioză vine de la cuvîntul grec „meion" care înseamnă a micşora. Într-adevăr, celulele rezultate din această diviziune prezintă un număr de cromozomi redus la jumătate în ra-

port cu celula inițială din care au provenit. E. van Beneden, la 1883, a fost acela care a constatat că la Parascaris equorum, gameții au doi cromozomi iar celulele somatice patru.

Meioza este caracteristică organismelor ce se reproduc pe cale sexuată. Procesului de dublare a numărului de cromozomi prin fecundare i se opune un proces invers de reducere a numărului de cromozomi, proces ce caracterizează meioza. Rezultă că fecundarea și meioza sînt fenomene compensatorii. Dacă organismele ce se reproduc sexuat ar forma gameți cu număr egal de cromozomi cu cel al celulelor somatice, cu fiecare generație numărul de cromozomi s-ar dubla ceea ce ar pune sub semnul întrebării existența speciei, căci cu fiecare generație ar apare forme noi. Meioza însă duce la evitarea unei asemenea situații. Meioza a apărut la un anumit moment al evoluției viețuitoarelor și ea a avut consecințe evolutive dintre cele mai semnificative. Segregarea independentă a membrilor diferitelor perechi de cromozomi duce la diversificarea genotipică, fiind una din căile prin care se realizează recombinarea genetică la organismele eucariote. Din unirea a doi gameți rezultă un zigot, care prezintă combinații randomizate de cromozomi. Tot meioza asigură, printr-un alt mecanism de recombinare genetică, și anume prin crossing-over, un spectru larg de combinații genice, care mărește potențialul adaptativ al speciei, plasticitatea sa.

Organismele ce se reproduc sexuat, prin fecundarea gameților, prezintă o alternanță de faze nucleare — diploidă și haploidă (Fig. 85).

Pentru animale este caracteristică meioza gametică sau terminală. În urma diviziunii meiotice apar spermatozoizii și ovulele care nu mai suferă diviziuni ulterioare, fiind celule extrem de specializate. Meioza terminală sau gametică caracterizează toate animalele metazoare, ca și unele plante inferioare precum alge din genul Fucus. Există un al doilea tip de meioză numită meioză de tip *zigotic* sau inițială, care are loc odată cu primele diviziuni ale zigotului, deci după ce s-a realizat fecundarea. Acest tip de meioză caracterizează de regulă plantele inferioare (bunăoară multe grupe de alge și ciuperci). Organismele ce prezintă acest tip de meioză prezintă o fază diploidă de scurtă durată, limitată la zigot. În urma meiozei zigotice, rezultă celule vegetative cu număr haploid de cromozomi, starea haploidă fiind caracteristică acestor organisme. La plantele superioare se întîlnește tipul de meioză sporală sau intermediară, numit încă nedeterminat. Ea se desfășoară în sporo-

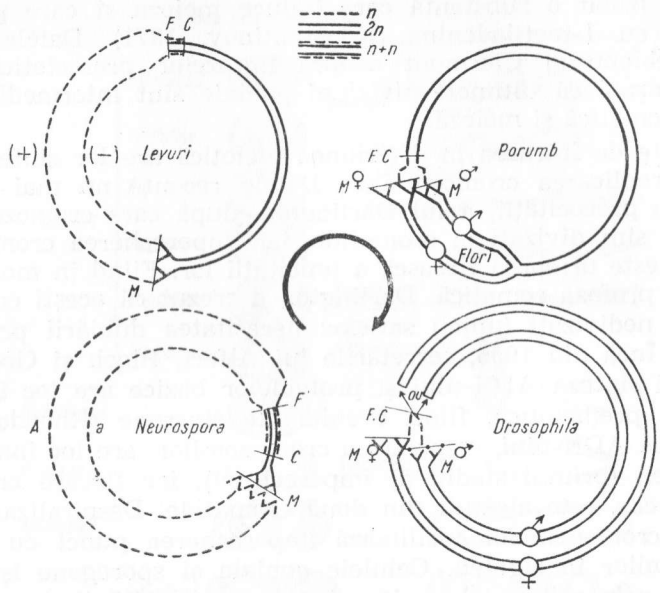


Fig. 85 — *Alternanța de faze nucleare* la cîteva organisme folosite frecvent în cercetările de genetică. (după C. Petit și G. Prévost, 1969).

fitul diploid la un punct intermediar între zigot și formarea gameților. Meioza în acest caz condiționează schimbul de generații, apărînd ca o parte a procesului general al sporogenezei, ducînd la nașterea nu a gameților, ci a mega- sau microsporilor haploizi, care în urma mitozei obișnuite vor da gameți masculi sau femeli. După contopirea gameților în procesul de fecundare apare zigotul care este diploid și care va da sporofitul. Gametofitul este haploid și se numește haplont, pe cînd sporofitul este diploid și se numește diplont. La asemenea organisme apare o alternanță între două generații antitetice, una sexuată (gametofitică) și alta asexuată (sporofitică).

La nivelul sporofitului anumite celule intră la un moment determinat în ciclul meiotic. La plante aceste celule se numesc sporogene și archesporale. La animale, celulele care vor suferi meioza se numesc ovogoniale și spermatogoniale. Este încă necunoscută cauza sau mecanismele care determină intrarea unei celule somatice în meioză. Recent din ovule de stea de mare, Kanatani și colabora-

torii au izolat o substanţă care induce meioza şi care pare a fi identică cu 1-metiladenina (Konstantinov, 1971). Datele lui Tobias, Leblond şi Clermont asupra mitozelor premeiotice la rozătoare arată că ultimele diviziuni goniale sînt intermediare între mitoză somatică şi meioză.

Înainte de intrarea în diviziunea meiotică are loc sinteza ADN-ului şi replicarea cromozomilor. Datele recente nu mai concordă cu teoria precocităţii, a lui Darlington, după care cromozomii meiotici nu sînt divizaţi în cromatide, iar împerecherea cromozomilor omologi este urmarea firească a unicităţii lor. Fiind în mod normal dubli în profaza somatică, Darlington a crezut că aceşti cromozomi meiotici nedivizaţi (unici) satisfac necesitatea dublării prin împerechere. Încă din 1955, cercetările lui Alfert, Bloch şi Godman au arătat că sinteza ADN-ului şi proteinelor bazice are loc în ultima interfază premeiotică, fiind evenimente sincrone (Rhoades, 1961). Replicarea ADN-ului, respectiv a cromozomilor, are loc înainte deci de zigoten (primul stadiu al împerecherii), iar fiecare cromozom, în acest caz, este alcătuit din două cromatide. Despiralizarea completă a cromonemelor facilitează împerecherea punct cu punct a cromozomilor în zigoten. Celulele goniale şi sporogene îşi măresc numărul prin mitoze obişnuite pînă la o anumită limită specifică, după care are loc trecerea de la diviziunea mitotică într-un ciclu meiotic. Celulele pregătite pentru a intra în ciclul meiotic se numesc ovocite, respectiv spermatocite primare la animale şi celule mame polinice şi celule mame ale megasporului la plante. Orice celulă care intră în ciclul meiotic se numeşte meiocită.

În meioză se succed două diviziuni dar cu o singură replicare a cromozomilor într-un ciclu celular (Fig. 86). Prima diviziune meiotică este reducţională. A doua diviziune meiotică decurge după tipul mitozei obişnuite, fiind ecuaţională. În timpul primei diviziuni meiotice se desfăşoară fenomene sinaptice — de conjugare a cromozomilor omologi. Cromozomii omologi sau pereche sînt acei cromozomi ai setului diploid din celulele somatice ce prezintă aceeaşi morfologie şi structură fină şi poartă aceleaşi gene. Aceşti cromozomi omologi, pereche, sînt aduşi la nivelul zigotului de către gameţi, aşa încît unul din cromozomii omologi este de origine maternă, adus de gametul femel, iar celălalt de origine paternă, fiind adus de gametul mascul. Sinapsisul sau conjugarea cromozomilor omologi în timpul profazei I duce la formarea bivalenţilor şi acest fapt a fost evidenţiat de către T. H. Montgomery, (1901) şi W. S. Sutton (1902). Cromozomii omologi de la nivelul bivalenţilor se

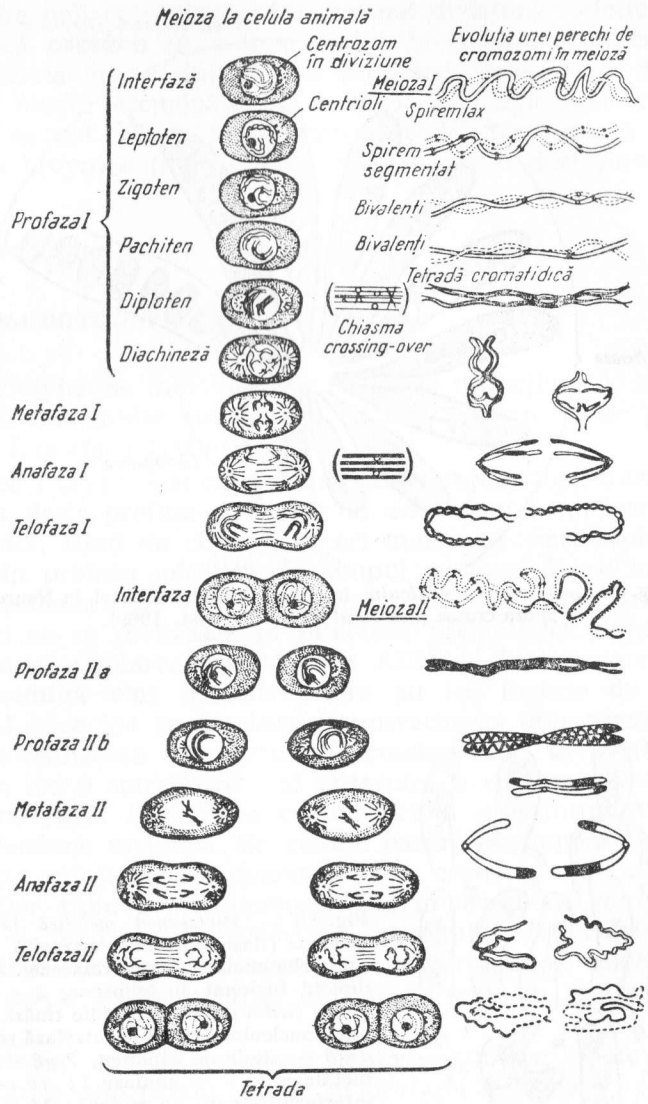


Fig. 86 — *Schema desfăşurării meiozei în celula animală şi a evoluţiei unei perechi de cromozomi în meioză.*

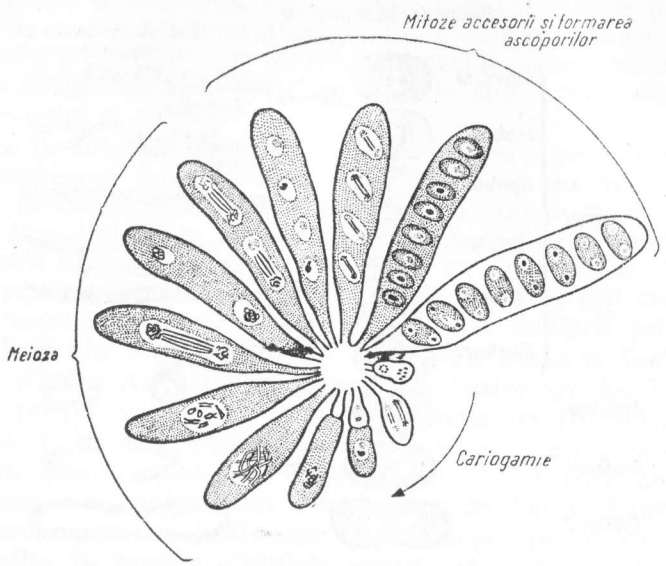


Fig. 87. — *Evoluția nucleului* în cursul dezvoltării ascei, la Neurospora crassa (din Petit și G. Prévost, 1969).

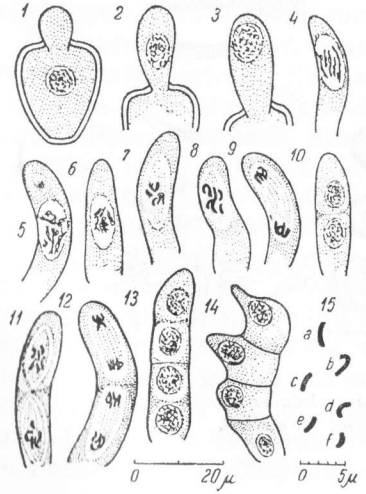


Fig. 88 — *Diviziunea meiotică la Ravenelia breyniae* (Basidiomycetes) parazită pe Melanthesa rhamnoides (Euphorbiaceae). *1* — nucleu diploid fuzionat în teliospor; *2* — nucleu diploid, fuzionat într-o bazidie tînără; *3* — lărgirea nucleului diploid în interfază sau leptoten; *4—6* — stadii de diploten, *7—8* — stadii ale metafazei I; *9* — anafaza I; *10* — nuclei în interfază aproape de profază; *11, 12* — metafaza II; *13* — patru nuclei haploizi separați prin citochineză; *14* — formarea sterigmelor; *15* — *a* la *f* — șase cromozomi ai complementului haploid, prezentînd diferite particularități morfolologice (după V. P. Singh, 1972).

separă spre poli opuși în anafaza primei diviziuni meiotice, fiecare celulă fiică primind un număr redus la jumătate de cromozomi față de celula mamă, inițială. În linii mari, meioza se desfășoară după un model asemănător la majoritatea organismelor care se reproduc sexuat. Chiar la ciuperci, precum Neurospora crassa și Ravenelia breyniae (Fig. 87, 88), meioza are o desfășurare tipică.

1. DESFĂȘURAREA MEIOZEI

a) *PRIMA DIVIZIUNE MEIOTICĂ*

Prima diviziune meiotică (Fig. 89) este reducțională. Ea se desfășoară în mai multe etape, care au fost desemnate ca: profaza I, metafaza I, anafaza I, telofaza I.

Profaza I (P_I) meiotică este de mare complexitate, durează mult mai mult decît profaza mitotică, în ea volumul nuclear crescînd semnificativ, fiind de circa 3—4 ori mai mare decît volumul nucleului din profaza mitotică. În timpul profazei I are loc o mică sinteză secundară de ADN, care completează sinteza principală a ADN-ului ce se realizează în interfaza premeiotică. Experimental s-a arătat că dublarea cantității de ADN și duplicarea replicativă a cromozomilor sînt fenomene care au loc înainte de zigotenul profazei I. Are loc de asemenea împerecherea cromozomilor omologi și se realizează fenomenul de crossing-over. În profaza I meiotică are loc o spiralizare mai puternică a cromozomilor decît în profaza mitotică. Diviziunea centromerului este întîrziată mult în prima diviziune meiotică. Se cunosc cazuri de împerechere a cromozomilor mitotici ca și fenomenul de crossing-over mitotic (somatic). Dar tipic pentru meioză este împerecherea cromozomilor omologi și realizarea în cadrul fenomenului de crossing-over a unui schimb reciproc de fragmente între cromatide omoloage. Trecerea dintr-un stadiu în altul al meiozei este un proces gradat și continuu.

Leptotenul (de la grecescul leptos = subțire; leptoten = filament subțire) este primul stadiu al profazei I. Nucleul meiocitei se mărește, iar cromozomii apar ca niște filamente foarte fine, subțiri, prezentînd o clară diferențiere a cromozomilor. Deși a avut loc replicarea cromozomilor înainte de leptoten, la microscop, cromozomii apar nedivizați în cromatide, deci ca niște filamente uni-

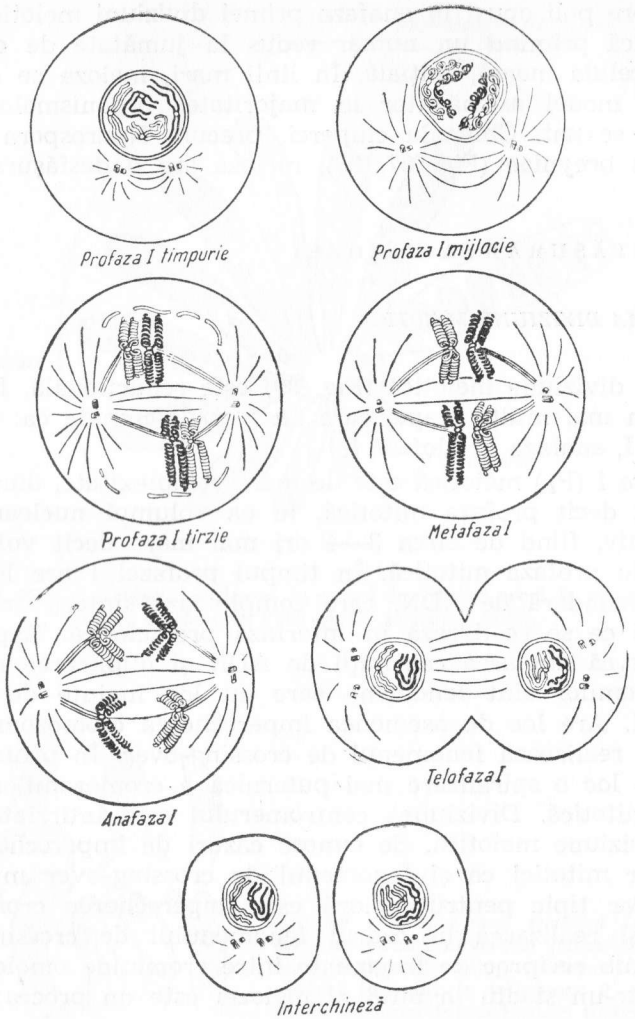


Fig. 89 — *Desfășurarea primei diviziuni meiotice la o celulă care prezintă 2n = 4 cromozomi* (din G. S. Stent, 1971).

ce. Numărul filamentelor cromozomale corespunde numărului diploid de cromozomi. Dar este dificilă identificarea cromozomilor în acest stadiu. Doar cromomerele sînt mai ușor identificabile, prezentîndu-se ca niște mărgele înșirate pe filamentul cromozomal,

(Fig. 90 a) fiind mai intens Feulgen-pozitive. Ele corespund porțiunilor cu spiralizare mai accentuată sau porțiuni în care se află o cantitate mai mare de nucleohistonă pe filamentul cromozomal. Dovada faptului că în leptoten cromozomii se află sub forma a două cromatide este adusă de experiențele de iradiere a cromozomilor leptotenici. Dacă în leptoten cromozomii ar fi încă nedivizați, atunci provocarea în acest stadiu a unor rupturi cromozomale prin iradiere cu raze X, ar trebui să se traducă mai tîrziu prin leziuni la nivelul ambelor cromatide fiice. Experiențele lui S. Mitra, la Lilium longiflorum, au arătat însă că în urma iradierii cu raze X, la cromozomi leptotenici, apar leziuni numai la nivelul uneia dintre cromatidele fiice, ceea ce înseamnă că în stadiul de leptoten, cromozomii sînt dedublați. Cromozomii leptotenici prezintă o polarizare remarcabilă, dînd impresie că pornesc dintr-un singur punct, dispunere care s-a numit „buchet". Aranjamentul cromozomilor în interiorul nucleului nu este întîmplător, polarizarea cromozomilor leptotenici (numită și orientarea Rabl) demonstrînd acest lucru.

Cromozomii din leptotenul tîrziu, încă neîmperecheați, prezintă gradul maxim de extensie. Cromomerele — aceste îngrămădiri ale spirelor de-a lungul cromonemei — sînt constante în dimensiuni, poziție și număr. Dublarea cromozomilor marcată și de dovada citochimică după care sinteza ADN-ului și histonelor este realizată înainte de zigoten, stadiu imediat următor leptotenului, arată că, cro-

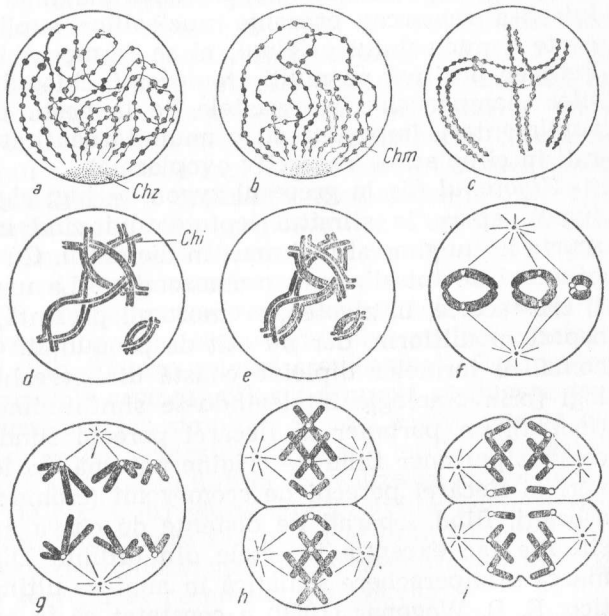


Fig. 90 — *Schema desfășurării meiozei la o celulă cu 6 cromozomi. a* — Leptoten; *b* — zigoten; *c* — Pachiten cu trei bivalenți; *d* — Diploten cu trei tetrade; *e* — Diakineză; *f* — Metafaza I (cu trei diade); *g* — Anafaza I; *h* — Metafaza II; *i* — Anafaza II; *Chi* — chiasme; *Chm* — cromomere; *Chz* — Cromocentri (după O. Hess, 1973).

mozomii intră în procesele sinaptice în condiţie dedublată. Capetele libere ale cromozomilor, mai ales la animalele la care cromozomii au centromeri localizaţi, sînt atrase în partea nucleului cea mai apropiată de centrozom, corpul cromozomului apărînd astfel buclat spre interiorul nucleului. Se apreciază că această dispoziţie în buchet a cromozomilor, păstrată pînă în pachiten, va facilita conjugarea capetelor distale ale cromozomilor omologi. Această dispunere în buchet sau nod sinizetic numite încă sinizesis (Fig. 90, a, b) este caracteristică pentru stadiul de leptoten la Lilium sp., şi pentru stadiul de zigoten la porumb. La Mantide, Hughes-Schrader a descris apariţia unui al doilea buchet în pachiten, după dispariţia celui leptotenic. Formarea buchetului este rezultatul interacţiunii capetelor cromozomilor (telomerelor) pe de o parte, ca şi al influenţei centrilor mitotici, pe de altă parte.

Nucleolul îşi dublează volumul şi cantitatea de ARN între leptoten şi zigoten atingînd dimensiunea maximă la mijlocul pachitenului. S-a remarcat prezenţa nucleolilor suplimentari ataşaţi de o parte a nucleolului original; ei se formează în loci heterocromatici Feulgen-pozitivi, pe mulţi cromozomi, chiar după formarea bivalenţilor „lampbrush" în ovocitele de la peşti. Uneori, aceşti nucleoli suplimentari, împreună cu o anumită cantitate de ADN, sînt eliberaţi în citoplasmă (respectiv ovoplasmă).

Zigotenul (de la grecesul zygon = jug; zigoten = filament conjugat), apare la sfîrşitul leptotenului cînd cromonemele sînt mai scurte în lungime şi mai mari în diametru. Cu alte cuvinte a început procesul de spiralizare a cromozomilor. La unele organisme, cum ar fi crustaceele, în zigoten, cromozomii prezintă, ca şi în leptoten, un aspect moniliform, dar nu atît de pronunţat. Complementul cromozomal al formelor diploide constă din perechi de cromozomi omologi (prin omologie înţelegîndu-se similitudine structurală şi funcţională), un partener al fiecărei perechi fiind de origine maternă, celălalt partener fiind de origine paternă. În leptoten cei doi parteneri ai fiecărei perechi de cromozomi (cromozomi omologi) nu sînt asociaţi, fiind separaţi de distanţe de cîţiva microni. De la această situaţie fac excepţie insectele din ordinul Diptera, la care se remarcă o împerechere somatică în anafaza ultimei diviziuni premeiotice. E. B. Wagenar (1969) a constatat că în mitozele ce preced diviziunea meiotică are loc o asociere cap la cap a cromozomilor la Allium cepa, Crepis sp., Nigella arvensis, Secale cereale etc. Semnificaţia acestei asocieri este de a asigura un sinapsis rapid şi regulat. Cromozomii omologi nu au o distribuţie întîmplătoare în diviziunile mitotice ce preced meioza. Forma, mărimea şi regiunile organizator

nucleolare exercită o influenţă notabilă asupra asocierii somatice a omologilor (R. S. Savasivaiah şi colaboratorii, 1969).

După stabilirea primului contact dintre cromozomii omologi are loc împerecherea acestora după modelul de închidere a fermoarului. Împerecherea cromozomilor are loc în două etape: în prima etapă membri perechii omoloage devin aliniaţi; în a doua etapă se stabileşte un contact iniţial la un capăt sau la ambele capete ale cromozomilor omologi şi apoi împerecherea se realizează pe toată lungimea lor. Sinapsisul cromozomilor omologi are loc în timpul zigotenului. Sinapsisul este iniţiat în vecinătatea membranei nucleare, căci bivalenţii sînt ataşaţi cu ambele capete de membrana nucleară, fiecare bivalent făcînd o buclă spre interiorul nucleului, apărînd configuraţia clasică a stadiului de buchet. Coalinierea prezigotenică a omologilor este urmată de progresarea împerecherii intime a cromozomilor prin formarea complexelor sinaptinemale. Prealinierea poate fi iniţiată în regiuni specifice precum centromerii, telomerele, zone heterocromatice sau cromomere sau la entităţi specifice cu funcţie de împerechere care s-au numit zigomere. Deşi există unele date, este încă neclar cum se pot găsi cromozomii omologi în zigoten în vederea conjugării lor. Împerecherea cromozomilor omologi se realizează cu extraordinară precizie. Împerecherea cromozomilor omologi este unul dintre cele mai importante evenimente ale meiozei. Ea este necesară pentru realizarea unui crossing-over eficient şi pentru disjuncţia ordonată a cromozomilor. Conjugarea (cuplarea-sinapsisul) nu începe neapărat la capetele cromozomilor ci, simultan, ea are loc în mai multe puncte pe lungimea cromozomilor omologi. Odată iniţiată, conjugarea se realizează punct cu punct pe toată lungimea cromozomilor, cînd cromozomii sînt perfect omologi, formîndu-se bivalenţi (Fig. 53) sau gemeni cromozomali. Conjugarea care este iniţiată la capetele cromozomilor s-a numit conjugare terminală. Cînd conjugarea are loc simultan în mai multe puncte ale filamentelor cromozomale se numeşte conjugare locală. Sinapsisul este, se pare, un proces lent. La Lilium el se realizează într-o formă stabilă abia după 24 de ore. Conjugarea cromozomilor omologi face să vie în contact fiecare cromomeră sau punct al unui filament cromozomal cu cromomera corespunzătoare de pe cromozomul omolog, făcînd astfel posibilă segregarea mendeliană a genelor.

Studiul la microscopul electronic al cromozomilor meiotici a evidenţiat un element structural, neîntîlnit la cromozomii mitotici, format în zigoten între omologii cuplaţi şi care este rezultatul conjugării, al fenomenelor sinaptice. Acest element structural, specific cromozomilor meiotici, a fost denumit de către Moses şi Coleman (1964), complex sinaptinemal (Fig. 91), fiind descris prima dată la peşti.

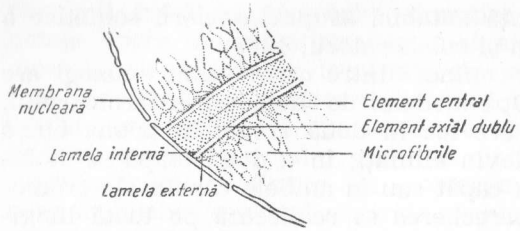


Fig. 91 — *Complex sinaptinemal.* Redare după o electronografie de Moses (din I. Steopoe, 1967).

Ulterior complexul sinaptinemal a fost evidenţiat la multe specii de plante şi animale, inclusiv la ciuperci (Westergaard şi von Wettstein, 1968) şi alge.

Complexul sinaptinemal este alcătuit dintr-o axă mediană de natură proteică de 150 μm lăţime, plasată între cei doi cromozomi omologi conjugaţi şi întinsă pe toată lungimea acestora. După Nobel şi Coulon complexul sinaptinemal este alcătuit din trei părţi: componente laterale, spirele laterale şi spaţiul medioaxial. Două elemente axiale, fibrilare, impenetrabile pentru electroni, prezintă structură dublă, fiecare avînd o grosime de 10 μm. De la elementele axiale pornesc radiar fibrile de circa 70 Å într-un spaţiu mai puţin impenetrabil pentru electroni, dintre cele două axe. Spaţiul acesta este de 120—150 μm, şi conţine în mijloc un alt element impenetrabil pentru electroni cu un diametru de circa 40 μm. Elementul central este variabil la diferite organisme. Fibrilele elementelor axiale exterioare se continuă în cromatina înconjurătoare, reprezentată de cei doi cromozomi omologi plasaţi de o parte şi de cealaltă a complexului sinaptinemal. Componentele laterale, cîte unul pentru fiecare omolog, reprezintă prin sine, cromatidele. Aceste componente laterale au un diametru de 600 Å. Spirele laterale ale complexului sinaptinemal sînt formate din filamente numeroase, subţiri, de 100 Å ce se pot întinde pe o distanţă de 5000 Å. Lungimea fiecărei spire este pînă la 1 μm. Aceste spire conţin ADN deoarece sînt degradate de DN-ază.

Nu se ştie încă nimic despre mecanismul împerecherii cromozomilor la nivel molecular dar, după modelul lui Watson şi Crick, se poate sugera că el implică împerecherea catenelor complementare de nucleotide ale ADN-ului de la cromozomi omologi spre a forma structuri dublu helicoidale — heteroduplexuri. Mecanismul prin care se împerechează cromozomii şi în care are loc crossing-overul este o problemă majoră, nerezolvată, a geneticii. Studiul electronmicroscopic al complexului sinaptinemal aduce unele date. Complexul sinaptinemal este alcătuit din elemente laterale şi centrale cu fibre de legătură între ele. Se pare, contrar speculaţiilor comune, că elementul central nu este suprafaţa de împerechere a cromozomilor omologi. În leptoten, elementele axiale, omoloage, deşi neîmperecheate, se aşează unul în apropierea celuilalt, pe membrana nucleară. De elementele laterale sînt prinse segmente scurte de fibre de cromatină care la microscopul optic apar sub formă de cromomere.

Complexul sinaptinemal, în esenţă proteic, mediază asocierea intimă a cromozomilor omologi, asigurînd în acelaşi timp asocierea la nivel molecular (D. E. Comings şi T. A. Okada, 1970). El se scurtează progresiv la mijlocul pachitenului, prezentînd încă contact cu membrana nucleară (A. J. Solari, 1970).

Complexul sinaptinemal al fiecărui bivalent este ataşat la membrana nucleară cu ambele capete, nu însă şi cu regiunile intermediare. Complexe sinaptinemale tipice au putut fi observate în electronomicrografii, la ascomiceta Neottiella rutilans (Fig. 92) de către M. Westergaard şi D. von Wettstein (1968). Aceste complexe sinaptinemale se formează între bivalenţi în timpul împerecherii şi se menţin pînă la sfîrşitul pachitenului. Există un singur complex sinaptinemal per bivalent, fiecare bivalent fiind format din patru cromatide.

La speciile diplontice-haplodiplontice se formează complexe sinaptinemale asemănătoare, în stadiul de leptoten-zigoten, între cromozomi omologi care sînt subţiri şi nespiralaţi. Aceste complexe sinaptinemale sînt păstrate pînă în pachiten, cînd cromozomii sînt în faza de contracţie. În consecinţă, sinapsisul ce implică formarea şi păstrarea complexelor sinaptinemale, poate să aibă loc fie între cromozomi, care sînt puternic contractaţi, precum la Neottiella, fie între cromozomi omologi, care sînt în stare de extincţie, necontractaţi deci, aşa cum se întîmplă la Angiosperme, insecte şi alte animale. Dar atît la Neottiella cît şi la speciile cu cromozomi profazici necontractaţi, sinapsisul va fi urmat la început de un stadiu în care cromozomii omologi manifestă o repulsie activă, fiind în contact doar în regiuni unde se formează chiasmele (stadiul de diploten) şi apoi de un stadiu în care bivalenţii manifestă o repulsie activă (diakineza). Atît la Neottiella cît şi la plante cu flori şi animale, cromozomii se contractă în timpul stadiilor diploten-diakineză. În timpul trecerii de la pachiten sau în diplotenul timpuriu complexele sinaptinemale sînt dezorganizate.

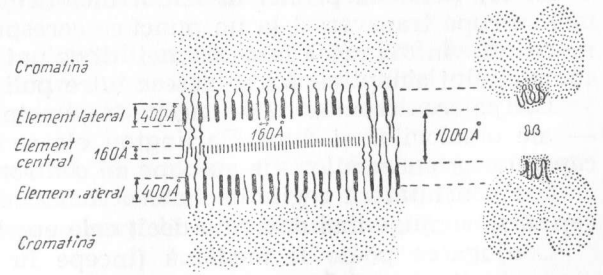


Fig. 92 — *Diagrama complexului sinaptinemal la Neottiella* (după Westergaard şi Wettstein, 1968).

Complexul sinaptinemal apare numai la omologii intim cuplați și aparent la aceia între care mai tîrziu se realizează crossing-overul. El nu a putut fi evidențiat în spermatocitele primare de la Drosophila, la care omologii se cuplează, dar nu are loc crossing-overul. În ovocitele primare însă s-au evidențiat complexele sinaptinemale și crossing-overul. Dar, după părerea lui Moses, (1968—1969) prezența complexului sinaptinemal este o condiție necesară, dar nu și suficientă pentru formarea chiasmei și realizarea crossing-overului. Complexul sinaptinemal se formează în cazul meiozei chiasmatice. În unele cazuri, precum la spermatocitele de Bolbe nigra, complexul sinaptinemal apare și în cazul meiozei achiasmatice (ce se desfășoară fără formare de chiasme).

Intervenția complexului sinaptinemal în realizarea crossing-overului duce la păstrarea îndelungată a împerecherii omologilor în stare de funcționare și stabilirea bazei structurale în cadrul căreia se realizează recombinarea prin schimb reciproc de fragmente de cromozomi omologi, adică prin crossing-over.

Complexul sinaptic pare a fi rezultatul așa-numitei cuplări efective, a cuplării pe cîmpul molecular în care are loc și crossing-overul. El apropie catenele de ADN în așa fel, încît se produce cuplarea bazelor complementare și crossing-overul. Complexul sinaptic este în mare parte format din proteină și într-o măsură mai mică din ADN. Nu s-a putut stabili dacă componenții săi proteici sînt sintetizați de novo în timpul formării sale. A. J. Solari (1970) apreciază că elementele laterale ale complexului sinaptinemal se separă în timpul diplotenului, formînd axe singulare de 300 Å lățime, înconjurate de fibrile de cromatină. Axele unice sînt continui și se termină pe membrana nucleară prin două capete: protuberanța și capătul simplu. Regiunile convergente ale axelor cuprind chiasmele. Complexul sinaptinemal, după acest autor, apare ca o structură tripartită.

În A_I (anafaza primei diviziuni meiotice), complexul sinaptinemal se rupe transversal la un punct ce corespunde cinetocorului cromozomal. În T_I (telofaza primei diviziuni meiotice), rămășițele complexului sinaptinemal se găsesc între poli sau la polii fusului.

Conjugarea cromozomilor începe în puncte primare — de contact — ale omologilor și după Darlington ele se află fie în apropierea capetelor cromozomilor, fie aproape de centromeri.

S-a constatat că regiunile heterocromatice ale cromozomilor încep să se conjuge mai devreme decît cele eucromatice.

Conjugarea poate fi mediană (începe în regiunile mijlocii ale cromozomilor omologi), procentrică (începe în regiunea centromerilor) și proterminală (începe la capetele cromozomilor). Conjugarea

cromozomilor omologi de-a lungul lor se numește parasindeză. Conjugarea poate fi adevărată (între cromozomi omologi) și falsă (între cromozomi neomologi sau între segmentele acestora, partenerii înfășurîndu-se numai unul în jurul celuilalt). În cazul conjugării false sau de torsiune nu are loc cuplarea punct cu punct sau cromomeră cu cromomeră și nu se formează chiasme.

Cînd se realizează o conjugare între brațele identice ale izocromozomilor, conjugarea se numește intracromozomală. La formele diploide și autopoliploide se întîlnește o conjugare homogenetică (între cromozomi total omologi), pe cînd la hibrizii din prima generație, dintre forme diploide, sau la alopoliploizi, conjugarea este heterogenetică (între cromozomii neomologi sau parțial omologi) și se realizează numai dacă aceste specii nu sînt izolate prin mecanisme de izolare legate de deosebiri structural-cromozomale.

Atunci cînd se realizează o conjugare nespecifică, între regiuni eucromatice și regiuni heterocromatice, așa cum a fost evidențiată de Slizynski la drosofila, conjugarea se numește ectopică. Între cromozomi neomologi conjugarea este nelegitimă. Acest tip de conjugare se realizează la allotetraploizi. Între cromozomii parțial omologi, la formele alopoliploide se realizează o conjugare selectivă — preferențială în funcție de mărimea regiunilor omoloage și neomoloage ale acestor cromozomi.

La diptere, s-a observat existența unei conjugări somatice, în care în profaza mitotică sau în metafază cromozomii omologi se apropie.

Pentru formele haploide sau aneuploide este caracteristică conjugarea cromozomilor neomologi.

Cînd între cromozomii conjugați nu se realizează un contact adevărat, ei rămînînd la o anumită distanță, conjugarea se numește distanțială. Ea este caracteristică cromozomilor de sex și cromozomilor heterocromatici.

Conjugarea normală, tipică, a cromozomilor, presupune formarea chiasmelor.

După unii autori, cromozomii manifestă în general tendința de conjugare. În ciclul mitotic nu se realizează de obicei conjugarea cromozomilor datorită particularităților lor de replicare și spiralizare.

Sax a fost de părere că în profaza meiotică, conjugarea este posibilă datorită despiralizării totale a cromozomilor, pe cînd în profaza mitotică spiralizarea parțială a cromozomilor împiedică conjugarea lor.

După alți autori, comportamentul cromozomilor în conjugarea meiotică este determinat de modul de funcționare a centromerului,

apropierea cromozomilor omologi fiind inițiată la nivel centromeric. Și forțele electrostatice au fost implicate în realizarea conjugării cromozomilor omologi, pe baza unei distribuții asemănătoare a sarcinilor. Unii autori au presupus că forțele de rezonanță determină, la cromozomii omologi, pulsația în aceeași fază a cromomerelor sau grupelor genice ce formează unități pulsatorii și care astfel duc la conjugarea cromozomilor omologi.

Interesantă este părerea lui Serra, după care cromozomii leptotenici prezintă numeroase proeminențe elastice, laterale, ce apar ca niște bucle flexibile sau fibrile extinse lateral, lungi de cîțiva microni. Prin întîlnirea acestor proeminențe laterale identice ale cromozomilor omologi, se realizează unirea lor intimă. Această situație caracterizează cromozomii de tip „lampbrush" și conjugarea lor se realizează după principiul închiderii copciilor de fermoar. Dar asemenea cromozomi în meioză se întîlnesc foarte rar, nefiind tipici pentru marea majoritate a cromozomilor leptotenici. Totuși, G. M. Jagiello (1969) constată la unii bivalenți chiar în metafaza I, caractere lampbrush, iar asemenea cromozomi lampbrush nu sînt caracteristici numai ovogenezei și spermatogenezei vertebratelor ci și nevertebratelor.

Cromozomii omologi se pot împerechea și rămîn asociați pînă în anafază, fără a apare chiasme așa cum se întîmplă la masculul de Drosofila și alte animale. Dar asemenea cromozomi omologi împerecheați sînt tipici pentru aproape toate diviziunile celulare ale dipterelor (din anafază pînă în profaza diviziunii următoare) nu numai în celulele glandelor salivare și gametocite.

Delbrück este de părere că forțele sinaptice reprezintă rezultatul interacțiunii chimice dintre cromozomii omologi, conjugarea reprezentînd asocierea intimă a unităților autoreproducătoare aflate în interiorul cromozomilor. Acest autor acordă în acest caz un rol deosebit componentelor proteice ale cromozomilor, fapt care a fost remarcat și în structura complexului sinaptinemal. Deoarece conjugarea, după acest autor, are loc înainte de reproducerea cromozomilor, trebuie să se realizeze o împerechere efectivă a unor subunități ale cromozomilor în timpul interfazei. Atracția dintre cromomerele cromozomilor omologi în timpul conjugării în accepția lui Lindegren și Bridges se explică prin ipoteza aglutinării, fiecare cromomeră acționînd ca antigen, formează pe suprafața sa un anticorp specific.

Și forțe intermoleculare de tip Van-der-Vaals au fost implicate în conjugarea cromozomilor omologi. Împerecherea s-ar realiza, cînd atracția dintre omologi, datorită forțelor Van-der-Vaals, este mai mare decît repulsia stratului ionic dublu.

Oricum, starea de despiralizare a cromozomilor meiotici este o condiție necesară pentru conjugare. Dar apar și unele excepții, așa cum au fost remarcate la Neurospora, Neottiella și Hypomyces ca și la alte ciuperci Ascomycetes și din ordinul Uredinales.

Între cromozomii omologi sinapsisul este determinat de o atracție specifică, pe cînd între cromozomii neomologi atracția este nespecifică și ea poate fi legată de remanieri intercromozomale.

În ultimul timp, la baza sinapsisului este pusă acțiunea unor fermenți sau a altor compuși specifici ce se formează în ciclul meiotic. După unii autori baza moleculară a sinapsisului ar fi procesul de formare a ADN-ului hibrid între catenele unice, separate, ale cromozomilor omologi, avînd loc, în acest fel, împerecherea „punct cu punct" a omologilor. Primul punct de contact în conjugare reprezintă punctul în care începe sinteza ADN-ului hibrid. În acest fel este explicată și baza moleculară a crossing-overului. La baza conjugării cromozomilor omologi stau procese biofizice și biochimice extrem de complexe despre care cunoștințele actuale sînt încă limitate.

Pachitenul (de la grecesul pachys = gros; pachiten = filament gros), reprezintă stadiul de cuplare stabilă a cromozomilor, deoarece complexul sinaptinemal rămîne intact. Conjugarea cromozomilor este deplină, completă și acest stadiu este de durată mare. Asocierea este intimă, cu împerechere cromomeră la cromomeră. Cromozomii omologi rămîn apropiați, se îngroașă și se scurtează. Omologii împerecheați constau din patru cromatide și se mai numesc tetrade cromatidice sau bivalenți. Numărul bivalenților reprezintă jumătate din numărul de cromozomi din celulele somatice. Astfel, se realizează reducerea aparentă a numărului diploid de cromozomi, deoarece conjugarea fiind atît de intimă, bivalentul poate fi luat drept un singur cromozom. Dar fiecare cromozom ce intră în alcătuirea bivalentului este deja duplicat, fiind alcătuit din două cromatide surori. Îngroșarea cromozomilor pachitenici se realizează prin creșterea progresivă în diametru a spirelor cromonemelor lor. Lungimea cromozomilor pachitenici de Bellevalia este de 1/4 sau 1/6 din aceea a cromozomilor leptotenici. Cromozomii pachitenici se pot răsuci reciproc unul în jurul celuilalt (Fig. 93, e), facilitînd astfel crossing-overul. Fiecare pereche de cromozomi pachitenici poate fi recunoscută după lungimea relativă, totală, poziția centromerului, modelele distinctive ale cromomerelor și prezența corpurilor heterocromatice mari numite knobs = protuberanțe, ce ocupă poziții specifice pe cromozomi. În timpul pachitenului se înfăptuiește schimbul reciproc de fragmente între cromozomi omologi, adică crossing-overul. Crossing-overul presupune fragmentarea cromatidelor și reunirea

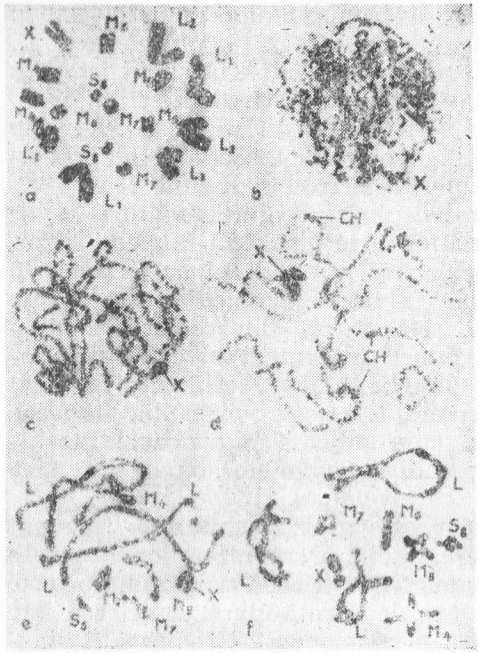


Fig. 93 — *Meioza la lăcusta Chorthipus parallelus* (preparate cu orceină acetică). *a* — mitoza spermatogoniilor (2n = 16 + x); *b* — leptoten (x cromozom heterocromatic); *c* — zigoten (polarizare în buchet); *d* — zigoten tîrziu; *e* — pachiten; *f* — diploten. Genomul acestei specii constă din 8 perechi de autozomi: 3 perechi mari de cromozomi metacentrici (L_1—L_3), 4 perechi de acrocentrici de mărime mijlocie (M_4—M_7) și o pereche de cromozomi acrocentrici scurți (S_8). Femela are 2 acrocentrici iar ♂ unul singur; *CH* — heterocromatină centrică (din O. Hess, 1973).

lor. S-a constatat că la porumbul *haploid*, în pachitenul timpuriu al microsporocitelor apar complexe sinaptinemale (sinaptoni), deplin diferențiate, cu cele trei elemente longitudinale. La începutul diplotenului aceste elemente se dezorganizează gradat, dispărînd în diachineză. Observațiile citologice și analiza genetică au indicat *inexistența* crossing-overului la haploizi. Ca atare complexul sinaptinemal nu joacă nici un rol esențial în realizarea crossing-overului meiotic. După Ting Y. C. (1973), complexul sinaptinemal este un produs al sinapsisului cromozomilor omologi sau neomologi. Se admite că acea sinteză secundară de ADN și proteină care se înregistrează în zigoten-pachiten ar avea rol în mecanismele reparatoare consecutive acestor ruperi-reuniri.

Între pachiten și diploten se instalează un stadiu numit stadiu difuz în care bivalenții sînt în sinapsis complet dar cromozomii devin greu identificabili morfologic. Ulterior ei se contractă, marcînd începutul diplotenului. S-ar putea ca acest stadiu „difuz" să fie cerut de sinteza suplimentară de ADN din profaza meiotică, sinteză implicată în mecanismele reparatorii ce au loc în urma „ruperii-reunirii" ce duce la realizarea crossing-overului meiotic. Cum, de regulă, la eucariote, sinteza ADN-ului se realizează în interfază, adică atunci cînd cromatina se află sub o formă „difuză" în nucleu, sinteza suplimentară de ADN din profaza meiotică necesită prealabil aceeași stare „difuză" a cromatinei.

Diploten (de la grecesul diploos = dublu; diploten = filament dublu).

În acest stadiu apare o repulsie, probabil de natură electrostatică, între cromozomii omologi, care tinde să separe cromozomii din bivalenți și care este o repulsie centrică. Cromozomii diplotenici formează bucle și noduri caracteristice. Ei continuă să se scurteze. Despărțirea bivalenților nu este deplină. Cromozomii rămîn uniți în puncte numite chiasme (denumirea vine de la cuvîntul grec, khiasma, plural chiasmata, care înseamnă așezare în cruciș și care a fost sugerat de litera greacă χ = chi). Aceste puncte de contact dintre cromatide (Fig. 94) facilitează schimbul de segmente între cromozomii omologi. Cu alte cuvinte, la nivelul chiasmei se realizează fenomenul de crossing-over. Chiasmele reprezintă în fond exprimarea citologică a realizării crossing-overului genetic. În urma crossing-overului rezultă cromatide remaniate care conțin material genetic atît de origine maternă cît și de origine paternă. După Darlington prezența chiasmelor previne desinapsisul și formarea univalenților. De asemenea chiasmele sînt necesare pentru asigurarea unei distribuții ordonate în anafaza I. La insecta Callimantis, între omologi nu se formează chiasme, dar aceștia rămîn împerecheați pînă în A_I. Natura forțelor de atracție în acest caz este pusă pe seama afinității dintre capetele cromozomilor (telomere). Pe baza teoriei chiasmatipiei, a lui Janssen și Darlington, chiasma reprezintă exprimarea crossing-overului genetic. Din cele patru cromatide numai două sînt implicate, de regulă, în schimbul reciproc. Numărul chiasmelor este caracteristic pentru fiecare pereche de cromozomi omologi. Numărul maxim de chiasme a fost determinat pentru cromozomul lung de Vicia faba și este de 12. Poziția și numărul chiasmelor

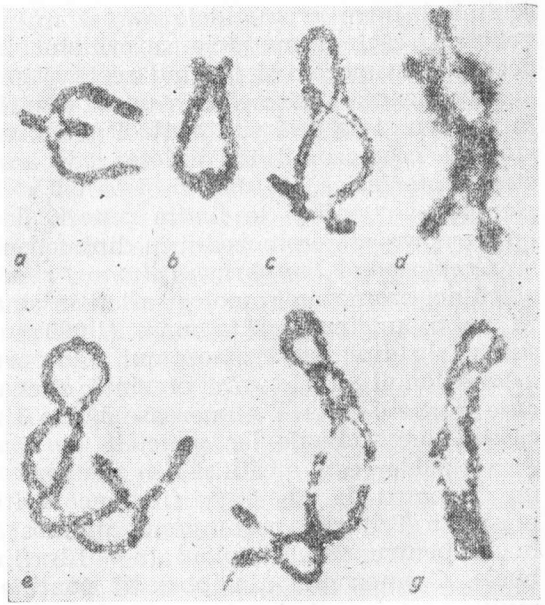


Fig. 94 — *Poziția chiasmelor în bivalenții cromozomilor metacentrici mari, la Chorthippus parallelus* (x. 2 350). *a* — schimb simplu; *b* — schimb dublu; *c*, *d* — schimb triplu; *e*, *f* — schimb cvadruplu; *g* — schimb cvindruplu. În *d* cromozomul prezintă un aspect plumos (din O. Hess, 1973).

determină configurația bivalentului în diploten și diakineză. Bivalenții cu chiasmă intermediară apar sub formă de cruce, pe cînd cei cu chiasmă terminală sub formă de baghetă. Perechile cu o chiasmă terminală la fiecare cap au formă inelară. Numărul maxim de chiasme apare în diploten. Cromozomii mai lungi au în mod obișnuit mai multe chiasme decît cei scurți, dar nu apare întotdeauna o proporționalitate directă între lungimea cromozomilor și frecvența chiasmei. La unele specii, precum Allium fistulosum, Fritillaria meleagris și Mecostethus sp., și chiasmele au localizare în apropierea centromerului pe cînd la altele, precum Philocleon au o localizare distală. La alte specii, localizarea chiasmelor este mai mult sau mai puțin randomizată. Diferențele dintre specii în frecvența chiasmelor, distribuția și terminalizarea lor sugerează că speciile diferă în raport cu diferențierea genetică a omologilor lor.

În general, chiasmele sînt considerate o consecință a crossing-overului realizat între cromatide nesurori, nefiind exclusă încrucișarea între cromatidele surori dar, în acest caz, dacă se realizează schimbul între cromatidele surori nu se ajunge la recombinarea genetică, căci cromatidele surori sînt identice genetic, aparținînd aceluiași cromozom și purtînd aceleași gene.

Localizarea chiasmelor în unele cazuri reflectă felul împerecherii în zigoten și se află sub control genetic. Este destul de greu să fie studiați cromozomii în diploten, deoarece ei revin adesea într-o stare interfazică, difuză în aparență. Chiar cromozomii de tip „lampbrush", aflați la limita puterii de rezoluție a microscopului optic reprezintă cromozomii în diploten modificat.

Cromozomul lampbrush (plumos) reprezintă de fapt un bivalent, adică doi cromozomi omologi aflați în sinapsă și prezentînd chiasme. Ei au o lungime foarte mare (1 000 μm = 1 mm), dar sînt foarte subțiri. În diploten, cromozomul „lampbrush" este alcătuit din două catene longitudinale care prezintă cîteva puncte de contact și din care pornesc lateral numeroase bucle fine. În realitate sînt patru catene longitudinale iar punctele de contact reprezintă chiasmata. Axa buclelor este alcătuită din filamente de ADN și proteine avînd un diametru de 60—80 Å, fiind acoperită de o matrice nucleoproteică. La Triturus, cromozomul plumos are circa 1 000 perechi de bucle pentru setul haploid (n = 12) fiind circa 12.000 asemenea bucle. Cromozomul „lampbrush" conține de circa 800 de ori mai multe proteine și de circa 100 de ori mai mult ARN raportat la ADN, comparativ cu cromozomul obișnuit. Cantitatea de ADN este de asemenea mult mai mare în acești cromozomi. Cromozomul lampbrush reprezintă în esență o pereche de filamente duble de ADN care în anumite puncte sînt strîns spiralizate formînd cromomerele, între care filamentele de ADN sînt fine și întinse. La nivelul fiecărei cromomere filamentele de ADN se separă de celălalt prezentînd extensiuni laterale ce apar sub forma a două bucle care pot sau nu să fie simetrice. Organizatorii nucleolari ai acestor cromozomi produc mulți nucleoli care se separă de cromozomi sub forma nucleolilor extracromozomali, fiecare conținînd cîte o copie replicată de ADN a organizatorului nucleolar. Pot fi pînă la 1 000 asemenea extranucleoli care produc material ribozomal. Miller și col. (1970) au surprins în electronografii filamentele de ADN ale buclelor laterale ale cromozomilor plumoși, avînd atașați pe ele polimeri de ARN, de diferite lungimi, adică în variate stadii de formare. Ei au numit această situație „gena în acțiune". La capetele cromozomului „lampbrush" se află telomerele. Zona îngroșată a fiecărui bivalent „lampbrush", ceva mai mare decît cromomerele, reprezintă centromerul. La sfîrșitul profazei meiotice, cromozomii lampbrush regresează, filamentul axial se îngroașă iar buclele laterale regresează și ele, cromozomii „lampbrush" căpătînd astfel configurația cromozomilor obișnuiți. Condiția „lampbrush" a fost considerată de unii autori ca un fel unic de condiție „interfazică" persistentă în profază, de vreme ce, în această stare, are loc o sinteză activă de ARN și de proteine procurînd material necesar pentru dezvoltarea ovulei după fecundare. Analiza genetică a stabilit că crossing-overul se realizează în stadiul de patru cromatide. Această concluzie s-a tras în urma analizei fenotipurilor femelelor de Drosofila. Acestea fiind dublu heterozigote, înseamnă că unul din brațele cromozomului X a suferit crossing-overul. Dacă crossing-overul s-ar fi produs în stadiul de două cromatide, acesta ar fi afectat toate cele patru brațe cromozomale. Aceeași concluzie s-a tras și în urma analizei produșilor meiozei la Neurospora crassa. Deoarece niciodată nu sînt afectați de crossing-over toți cei opt ascospori ai ascei, înseamnă că schimbul reciproc (recombinarea genetică) de fragmente se realizează numai în stadiul de patru cromatide. Deoarece procentul de recombinare, valorile combinatorii noi ale genelor inițial așezate într-o anumită ordine pe cromozomi, nu depășesc 50%, se consideră că în mod sigur crossing-overul are loc în stadiul de patru cromatide (două cromatide pentru fiecare cromozom omolog), fiind afectate doar două din cromatidele nesurori.

Considerînd o singură pereche de cromozomi cu centromeri localizați și că unul din cei doi omologi poartă alelele recesive a și b, pe cînd celălalt, alelele dominante A și B, ordinea liniară a genelor este: centromer — A — B. Dacă se formează o chiasmă între locii A și B, ea poate reprezenta un crossing-over genetic între două cromatide nesurori. În metafaza I-a acest bivalent este coorientat

pe fus cu centromerul unui omolog deasupra plăcii ecuatoriale și cu celălalt centromer dedesubt. Cei doi centromeri ai bivalentului trec spre polii opuși în anafaza I-a. În urma segregării anafazice o diadă cromozomală constă din cromatide AB și Ab. Cealaltă diadă are cromatidele ab și aB. Locusul A suferă o segregare reducțională în anafaza I-a, deoarece cele două cromatide ce poartă locusul A merg spre același pol, iar celelalte cromatide ce poartă locusul „a" merg spre polul opus. Fiecare diadă cromozomală separată la cei doi poli opuși posedă o alelă B și o alelă b. Rezultă deci că și acest locus a suferit o segregare ecuațională. A doua anafază meiotică va fi ecuațională pentru locusul A și reducțională pentru locusul B. În anafaza I-a a avut loc prereducția în cazul segregării reducționale, iar în anafaza a II-a a avut loc segregarea ecuațională cu postreducție. Realizarea crossing-overului este supusă fenomenului de interferență. Un schimb de fragmente poate inhiba (interferența pozitivă), de cele mai multe ori, alt schimb reciproc de fragmente cromatice. Mai rar, un schimb de fragmente cromatice poate stimula (interferența negativă) alte schimburi. Se apreciază că unele cromatide pot participa la schimb mai rar sau mai frecvent decît altele. Coeficientul de coincidență reprezintă raportul dintre numărul chiasmelor duble, determinat, și numărul chiasmelor duble, așteptat. Cînd valoarea acestui coeficient de coincidență este zero, formarea unei chiasme elimină cu totul posibilitatea formării altei chiasme. Cînd valoarea sa este egală cu unitatea, formarea unei chiasme nu are nici o influență asupra formării altor chiasme. Între numărul chiasmelor și frecvența crossing-overului există o anumită corespondență, fapt evidențiat pentru prima dată de către Darlington studiind meioza la porumb. Studiul meiozei și analiza genetică și la alte organisme au confirmat această afirmație a lui Darlington, stabilindu-se în general un raport unitar între numărul chiasmelor și crossing-over.

Sînt interesante ipotezele asupra formării chiasmelor. De largă circulație este ipoteza *chiasmatipiei,* elaborată de Janssen și aprofundată de Darlington. După această ipoteză, schimbul de fragmente între cromatidele nesurori apare înainte de formarea chiasmelor, iar chiasmatipia apare deci ca o consecință a schimbului. Fiecare chiasmă corespunde locului unde s-a realizat crossing-overul. Schimbul genetic, realizat în urma apariției chiasmei, a fost desemnat prin termenul de crossing-over — ceea ce ar însemna încălecarea cromatidelor. Dar acest lucru nu are loc în realitate. Mai curînd are loc o rupere la nivelul punctelor corespondente ale cromatidelor omoloage urmată de reunirea „greșită" a cromatidelor fragmentate, așa încît cromatidele supuse acestui schimb reciproc reprezintă un

mozaic de material genetic de origine maternă și de origine paternă (Fig. 95), fapt care nu se poate realiza în diviziunea mitotică decît în cazuri excepționale. Spre sfîrșitul diplotenului, chiasmele migrează spre capetele cromozomilor din care cauză perechile de cromozomi apar adesea sub formă de inel sau lanț înnodat. Ca rezultat al alunecării chiasmelor spre capetele bivalenților — proces care se numește terminalizarea chiasmelor — are loc micșorarea progresivă a numărului chiasmelor. Gradul de terminalizare se exprimă cu ajutorul coeficientului de terminalizare care reprezintă raportul dintre numărul chiasmelor terminale și numărul total de chiasme. Frecvența chiasmelor este dată de raportul dintre numărul total de chiasme și numărul total de bivalenți. Alunecarea chiasmelor spre capetele libere ale bivalenților reprezintă un proces complex bazat pe acțiunea forțelor electrostatice. Terminalizarea deplină a chiasmelor la bivalenți, alcătuiți din cromozomi metacentrici, duce la formarea figurilor inelare. După Swanson (1963) forțele care determină terminalizarea chiasmelor apar ca rezultat al despiralizării ca și al posibilei interacțiuni dintre centromeri și membrana nucleară. Pe de altă parte Östergren admite că terminalizarea este consecința respingerii elastice a cromozomilor omologi. În afară de inele, bivalenții pot avea formă de cruce (de X) și de baghetă (bastonas).

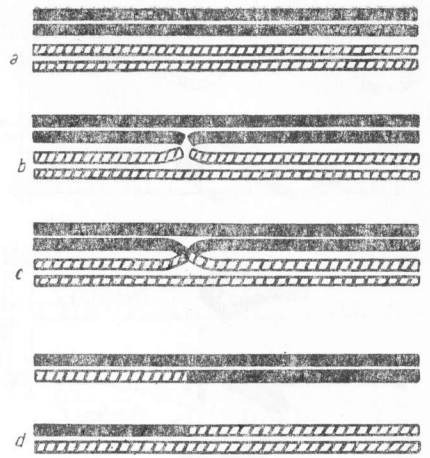


Fig. 95 — *Modelul ruperii — reunirii în realizarea crossing-overului. a.* cromozomii înainte de a intra în diviziunea meiotică; *b, c* — cromozomii în timpul profazei meiotice; *d* — cromozomii după prima diviziune meiotică (după O. Hess, 1973).

Henderson consideră că terminalizarea nu este atît de frecventă cum s-ar părea. Spre sfîrșitul diplotenului, numărul spiralelor cromonemelor scade, crescînd diametrul lor. Cromozomii se scurtează și se îngroașă (Fig. 96). Mecanismul de crossing-over se poate explica prin teoria chiasmatipiei după care recombinarea genetică este privită ca o consecință a schimburilor reciproce între cromozomi omologi (între cromatide nesurori) în profaza I. Dar teoria chiasmatipiei nu poate explica existența recombinărilor genetice între porțiuni foarte scurte.

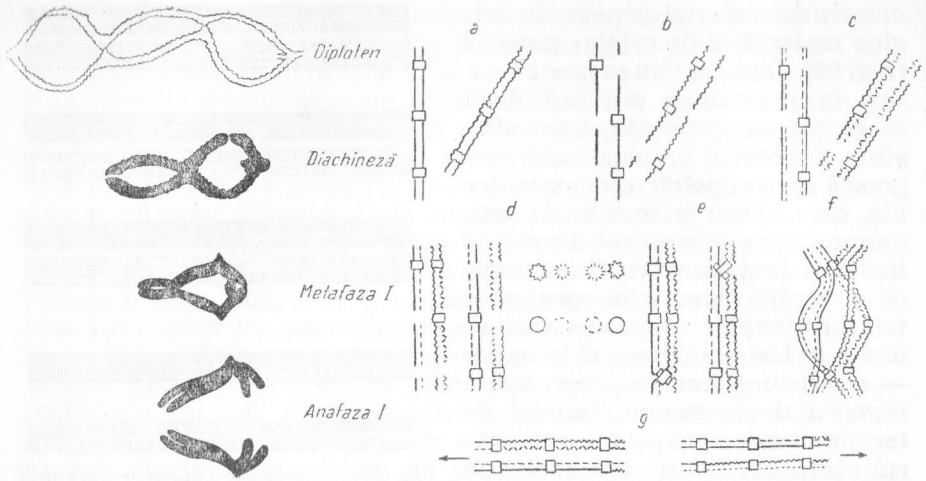


Fig. 96 — *Schimbările suferite de un bivalent datorită contracției și terminalizării chiasmelor* (după Stebbins, 1971).

Fig. 97 — *Schema lui Uhl* prin care se arată legătura dintre replicarea premeiotică a ADN-ului și realizarea crossing-over-ului. Fiecare cromozom omolog este reprezentat printr-o dublă spirală de ADN ale cărei catene sînt unite de verigi de legătură. *a* — perioada G_1; *b* — sfîrșitul perioadei G_1; *c* — terminarea replicației ADN; *d* — tetrada cromatidială după sinapsis pînă la sinteza noilor verigi de legătură (în dreapta tetradei, în secțiuni transversale); *e* — stadiul de pachiten; *f* — stadiul de diploten în care slăbesc forțele atracției sinaptice și cromatidele rămîn unite la anafaza I. Linkerii pot uni molecule de ADN ce aparțin la cromozomii omologi realizîndu-se crossing-over-ul (după Uhl, 1965, din N. Giosan și N. Săulescu, 1969).

Recombinarea genetică în meioză, după unele ipoteze, ar reprezenta consecința schimbului matriței în cursul replicației ADN-ului și cromozomilor. Pentru aceasta, cromozomii trebuie să aibă o anumită bază structurală pentru schimbarea matriței și realizarea schimbului reciproc. Freese a propus, în 1958, un model după care moleculele de ADN reunite între ele de grupările proteice prezintă două posibilități de schimb care se pot realiza sincron sau asincron. Aceste posibilități de schimb sînt în interiorul spiralei de ADN și la locul de unire al acestor spirale.

După Uhl (1972), pînă la perioada sintetică din interfaza mitotică și meiotică, cromozomii sînt alcătuiți din segmente de duble spirale de ADN. Înainte de sinteza ADN, spirala sa dublă se separă în două lanțuri polinucleotidice (Fig. 97). Cînd se formează grupările de legătură între aceste lanțuri polinucleotidice poate avea loc și schimbul de fragmente de ADN între cromatide nesurori. Este interesantă această ipoteză a lui Uhl, dar încă nu se cunoaște natura grupărilor de legătură. Cromatidele, indiferent dacă sînt multicatenare sau unicatenare, reprezintă unitatea funcțională în crossing- over. O explicare a crossing-overului admite că recombinarea are loc înainte de împerecherea zigotenică, în timpul replicării ADN-ului (Fig. 98). Se sugerează că contactul dintre cromozomii omologi apare în interfază sau în profaza foarte timpurie în timpul replicației ADN-ului. Contactul dintre omologi duce la recombinarea prin „copy-choice" adică catenele nou formate de ADN au schimbat reciproc matrița după care s-au sintetizat (Fig. 99).

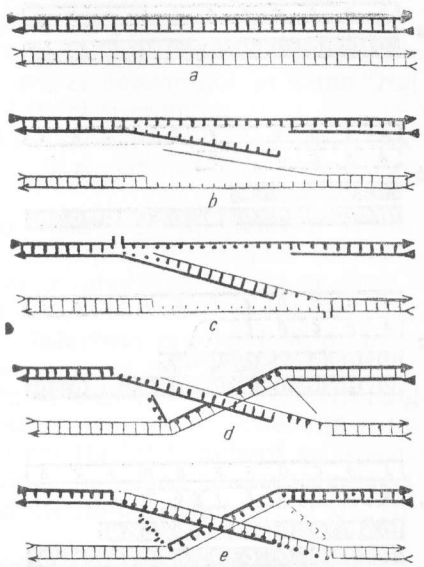


Fig. 98 — *Modelul molecular al crossing-over-ului*. *a* — două cromatide reprezentate de cîte o moleculă dublu catenară de ADN, în fiecare producîndu-se cîte o ruptură; *b* — desfacerea catenelor de ADN la punctul de rupere; *c* — reasocierea inversă a catenelor care au suferit fragmentarea pe baza complementarității bazelor azotate; *d* — reasocierea inversă a catenelor care nu au suferit fragmentarea; *e* — înlocuirea gap-urilor (golurilor) printr-o sinteză locală de ADN (din O. Hess, 1973).

După ipoteza lui Whitehouse, fiecare cromatidă în timpul încrucișării este alcătuită numai dintr-o singură dublă spirală de ADN. Încrucișarea are loc în stadiul de zigoten, cînd se termină sinteza cantității de bază de ADN. Pentru realizarea schimbului, este necesară prelungirea sintezei ADN-ului, care asigură formarea porțiunilor cu ADN hibrid. Sinteza aceasta prelungită de ADN însoțește dezorganizarea unei cantități comparabile de ADN vechi.

Ipoteza lui Whitehouse (Fig. 100) prezintă și unele dovezi experimentale. Prin autoradiografie s-a putut constata într-adevăr prelungirea sintezei ADN-ului pînă la stadiul de zigoten, cînd începe conjugarea cromozomilor omologi. Uneori această sinteză suplimentară a fost evidențiată și în pachiten, adică atunci cînd conjugarea cromozomilor omologi este deplină.

Ipoteza lui Whitehouse poate explica și apariția segregării atipice în limitele unor grupe de linkaj foarte strînse. De asemenea se

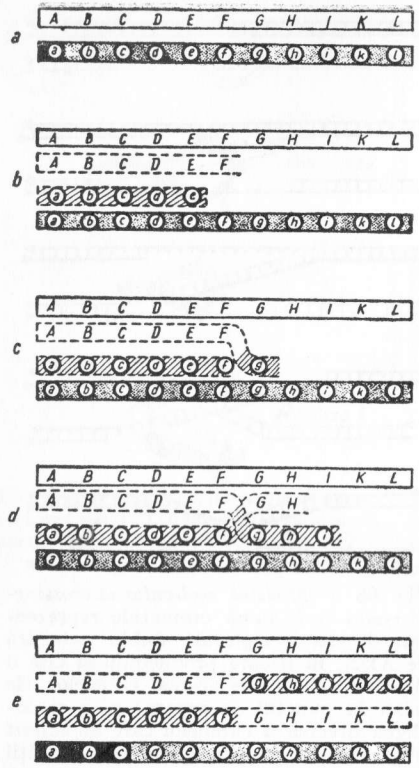


Fig. 99 — *Ipoteza lui Belling privind mecanismul de crossing-over (copy-choice). a* — cromozomii înaintea ultimei replicări premeiotice (faza S); *b* — replicarea cromatidelor după modelul semiconservativ în care vechile cromatide servesc drept matriță pentru sinteza noilor cromatide. Replicarea în cromatida superioară (albă) este mai rapidă; *c* — stadiul tîrziu al fazei S. Cromatida superioară albă, nou-sintetizată, și-a schimbat matrița (copy-choice) folosind drept matriță cromatida inferioară (neagră); *d* — stadiul și mai înaintat al fazei S. Se continuă replicarea. Cromatida nouă (hașurată) și-a găsit matricea ocupată și din acest punct folosește ca matriță cromatida albă, superioară; *e* — cromatidele după a doua diviziune meiotică. Cromatidele vechi sînt neschimbate, cele nou sintetizate sînt recombinate.

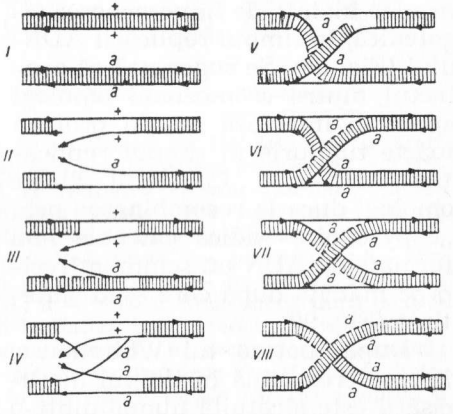


Fig. 100 — *Modelul molecular al crossing-over-ului după Whitehouse I* — două cromatide omoloage, fiecare corespunzînd unui dublu helix de ADN (liniile verticale reprezintă punțile de hidrogen dintre bazele azotate); *II* — fragmentarea catenelor de ADN opus polarizate, în puncte specifice; *III* — sinteza catenelor noi se realizează de-a lungul catenelor vechi rămase intacte și sînt complementare acestora; *IV* — catenele nou-sintetizate se separă de cele vechi, împerechindu-se cu porțiunile complementare de pe cealaltă cromatidă; *V—VIII* — formarea noilor catene în urma fragmentării celor vechi și realizarea crossing-over-ului (după Whitehouse, 1965, din N. Giosan și N. Săulescu, (1969).

explică și existența fermenților „reparatori", legați de sinteza suplimentară de ADN din profaza I, ADN care, la rîndul său, este implicat în mecanismul refacerii structurii cromozomilor în urma fragmentării provocate de diverși factori fizici și chimici.

Procese foarte complicate de natură biofizică, biochimică și fiziologică stau la baza crossing-overului și aspectului său citologic reprezentat de chiasmatipie.

După R. H. Pritchard, în cursul interfazei premeiotice cromozomii se mișcă dezordonat în toate direcțiile, în nucleul meiocitelor. În același timp, atingerea regiunilor omoloage ale lor ar duce la aderarea cromozomilor omologi. Astfel, Pritchard admite că încă în timpul replicării cromozomilor, în interfaza premeiotică, ar putea avea loc crossing-overul și că primele puncte de contact de la începutul profazei I reprezintă puncte în care deja s-a realizat crossing-overul, acesta apărînd astfel ca o cauză și nu ca o consecință a împerecherii cromozomilor omologi. Afirmația lui Pritchard se bazează pe fenomenul de interferență negativă, care face ca crossing-overul să fie mult mai frecvent întîlnit decît ne-am aștepta, pe distanțe foarte mici.

Cercetări recente au dus la concluzia că procesele sinaptice ale profazei I-a meiotice se desfășoară în trei etape. În prima etapă are loc o împerechere premeiotică, o aliniere a cromozomilor omologi. În a doua etapă se realizează sinapsa (conjugarea) cromozomilor omologi, mediată de formarea complexului sinaptinemal, iar în a treia etapă are loc împerecherea între secvențe similare de baze azotate din ADN-ul cromozomilor omologi cu formarea de heteroduplexuri de ADN. Există gene care controlează sinteza unor proteine de împerechere, proteine alosterice, capabile să se unească specific cu o anumită secvență de nucleotide. Există proteine de împerechere bivalente care se prind mai întîi de un cromozom la nivelul unei anumite secvențe de nucleotide iar apoi de cromozomul omolog la nivelul unei secvențe de nucleotide complementare, corespunzătoare, asigurîndu-se astfel o asociere intimă a cromozomilor omologi, asociere bazată pe similitudine de secvențe de baze azotate. Acesta ar fi, după Comings și Okada (1970 a—c), mecanismul molecular al împerecherii cromozomilor în meioză. În aceste procese intervin enzime caracteristice numite endonuclează, polinucleotid-kinază și polinucleotid-ligază, aceasta aflîndu-se în cea mai mare cantitate tocmai în profaza meiotică, intervenind în procesele de rupere-reunire în timpul recombinării genetice.

Recombinarea genetică la eucariote, realizată prin crossing-over meiotic și mitotic, are loc invariabil după ce cromozomii se replică, dar implică doar cîte o cromatidă de la fiecare cromozom din biva-

lent. Sinteza unei mici fracţii de ADN reprezentînd 0,3% din ADN-ul total, în zigoten, fracţie bogată în guanină şi citozină, este considerată a interveni în procesele reparatorii, ce acţionează după procesul de rupere şi reunire a cromatidelor, care înlesneşte realizarea recombinării genetice.

Frecvenţa crossing-overului şi formarea chiasmelor sînt fenomene condiţionate de lungimea şi particularităţile de structură ale cromozomilor. La autozomi, în diploten, există o corelaţie între lungimea cromozomilor şi numărul mediu de chiasme. Între cromozomii X şi Y la cimpanzeu şi om nu a putut fi evidenţiată prezenţa unei chiasme reale, cromozomii aceştia asociindu-se cap la cap în cursul primei diviziuni a spermatocitelor.

Nolte (1969) constată că la lăcustă, efectul epistatic asupra frecvenţei joase a chiasmelor este determinat poligenic. Cu ridicarea temperaturii creşte şi frecvenţa chiasmelor. Încrucişarea se petrece rar în zona centromerului cu regiuni adiacente heterocromatice. Pe măsura îndepărtării de centromer, frecvenţa chiasmelor se măreşte. Sub influenţa factorilor externi, frecvenţa chiasmelor este foarte variabilă, mai ales în regiunile heterocromatice care sînt mai labile.

La masculii de Drosofilă (XY) şi femelele viermelui de mătase (XO) se formează foarte rar chiasme în profaza I, din care cauză, meioza este achiasmatică. Cînd acest proces se ralizează în etapele mai timpurii ale dezvoltării celulelor sexuale (spermatogonii şi ovogonii), crossing-overul se numeşte gonial. În urma iradierii cu raze X s-a constatat că la masculii de drosofilă poate avea loc crossing-overul. De asemenea Bridges a remarcat la drosofilă dependenţa frecvenţei crossing-overului de condiţiile de creştere a organismului.

Crossing-overul se află sub un anumit control genetic de vreme ce nu există crossing-over la masculul de drosofilă şi numeroase alte insecte (Diptera, unele Mantide, lăcuste şi Mecoptera), unele flagelate, foramimfere, gregarine, Heliozoare, unele moluşte, viermi, copepode, coccide şi Trillium Kamtschiaticum. Aceste organisme se numesc achiasmatice. La unele mutante asinaptice crossing-overul este probabil preîntîmpinat mai curînd decît sinapsisul şi aceste mutante se numesc desinaptice.

Modificările în condiţiile de creştere a organismului se reflectă şi asupra comportamentului meiotic al cromozomilor. Se ştie că, la om, nondisjuncţia cromozomilor X, ca şi a cromozomilor perechii 21, devine mai frecventă la femeie, după vîrsta de 35—40 ani.

S-a demonstrat de asemenea dependenţa frecvenţei crossing-overului de condiţiile de temperatură. La Drosofila, de exemplu, temperaturile joase de 9—13°C, precum şi temperaturile ridicate de

30—32°C, condiţionează mărirea frecvenţei chiasmelor. Se apreciază că genotipul controlează variabilitatea genetică prin reglarea frecvenţei chiasmelor şi a crossing-overului (V. Ranga Rao şi B. R. Murty, 1972). Controlul frecvenţei chiasmelor este poligenic. La secară, genotipul controlează recombinarea la trei nivele: plantă, celulă şi bivalenţi.

Diplotenul la unele animale reprezintă stadiul cu cromozomi lampbrush cu extensiune maximă, deplin dezvoltaţi şi activi. Diplotenul în unele ovocite poate dura săptămîni, luni şi ani (la femeie, ovocitele pot să rămînă în acest stadiu meiotic începînd din a cincea lună de viaţă intrauterină cînd începe ovogeneza, pînă la 50 ani (Ohno, S. col. 1962). Asemenea diploten lung s-a numit dictioten. În acest stadiu, ADN-ul cromozomilor „lampbrush" desfăşoară transcripţia ADN, iar, în ovocitele amfibienilor, în acest stadiu, ADN-ul nucleolar se replică de nenumărate ori (amplificare genică).

Diachineza (de la grecescul dia = prin şi kinesis = mişcare).

Încă din diploten complexul sinaptinemal începe să se dezagrege iar cromozomii omologi să se îndepărteze, fără însă a se separa. Pentru disjuncţia cromozomilor omologi este necesară sinteza unui ADN în profaza meiotică cu rol de a asigura refacerea zonelor rupte în urma ruperii şi reunirii cromozomilor.

Forma bivalenţilor în diachineză este variabilă şi determinată de forma cromozomilor şi poziţia chiasmelor: *bagheta* (cînd există la nivelul bivalentului o singură chiasmă terminală), *inelară* (cînd există cîte o chiasmă la fiecare capăt al bivalentului; *dublu inelară* (există trei chiasme — cîte o chiasmă la fiecare capăt şi alta la mijlocul bivalentului — interstiţială); *un inel cu două capete proiectate lateral* (o chiasmă terminală şi alta interstiţială). Bivalenţii în cazul cromozomilor foarte mici apar ca două sfere adiacente.

Diachineza reprezintă ultimul stadiu al primei profaze meiotice (profaza I). În diachineză are loc o puternică scurtare a cromozomilor, aceştia atingînd dimensiunea tipică din metafaza I. Scurtarea cromozomilor se realizează prin apropierea girilor cromonemelor. Terminalizarea chiasmelor este completă. Prin deplasarea chiasmelor dinspre centromer spre capetele cromozomilor se micşorează numărul chiasmelor intermediare, cromatidele rămînînd unite pînă în metafaza I prin chiasme terminale. Încă din diploten, dar cel mai trîziu în diachineză, se dezintegrează nucleolul. Paralel cu dezorganizarea nucleolului se remarcă creşterea bazofiliei cromozomilor. Din această cauză, McClintock a sugerat că materialul nucleolar este încorporat în cromozomi.

Dacă în stadiile anterioare diakinezei, distribuţia cromozomilor în nucleu este mai mult sau mai puţin randomizată, în diachineză bivalenţii se îndepărtează unii de alţii, luînd o poziţie constant periferică în nucleu. Această dispoziţie apare ca o regulă la cele mai multe organisme la care s-a studiat meioza. Astfel, la Anopheles stephensi, în meioză, dizolvarea nucleolului se realizează în stadiul de diploten, cînd bivalenţii sînt condensaţi, iar cromozomii de sex sînt asociaţi numai pe o regiune scurtă, în apropierea centromerilor. În diachineză se accentuează condensarea, care este însoţită de terminalizarea chiasmelor. În acest stadiu, bivalenţii au o dispoziţie regulat periferică în nucleu (N. Rishikesh, 1967). Acelaşi lucru este constatat şi de A. N. Bhatnager (1967) la Oligodon arnensis (Colubridae) (Fig. 101). La această specie, în M_I, se remarcă o dispoziţie preferenţială a bivalenţilor mari la periferia fusului, iar a celor mici spre interior. Este interesant, că această migrare (mişcare) periferică a bivalenţilor apare atît la formele cu centromeri localizaţi, cît şi la cele cu centromeri difuzi.

La Brachystethus şi Mecistorhinus, autozomii diachinetici iau o poziţie intermediară între cei doi centri de diviziune, ceea ce l-a determinat pe Schrader să sugereze existenţa unei influenţe a centrilor de diviziune asupra bivalenţilor. Ideea aceasta este susţinută şi de situaţia înregistrată la Anisolabis, la care bivalenţii diachinetici se repartizează în două grupe plasate la polii opuşi ai nucleului, acolo unde se află centriolii (Rhoades, 1961). Acestea sînt organisme cu centromeri nelocalizaţi şi se pare că, în cazul lor, centri de diviziune au o influenţă semnificativă asupra mişcării în diachineză.

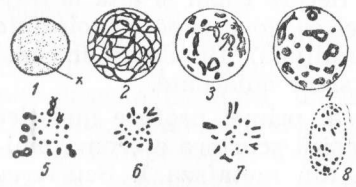


Fig. 101 — *Meioza la Oligodon arnensis* Shaw (Colubridae, Ophidia) (după A. N. Bhatnagar, 1959). *1* — nucleu în leptoten cu un singur element heteropicnotic bipartit (x); *2* — bivalenţi pachitenici — se pot vedea knobi (protuberanţe) heterocromatici; *3—4* bivalenţi în diploten şi diachineză; *5* — metafaza I (vedere polară) *6, 7* — metafaza II (vedere polară) *8* — anafaza II (vedere polară).

La sfîrşitul diachinezei se înregistrează dizolvarea membranei nucleare şi concomitent apare în citoplasmă fusul de diviziune.

În această fază, la unele organisme, apare o tensiune premetafazică, fapt ce denotă atracţia dintre centromeri şi centrul de diviziune şi care determină o separare incipientă a regiunilor centromerice omoloage.

Primele legături centromer-pol se realizează înainte de metafaza I şi anafaza I. Dacă centromerul unuia dintre omologii bivalentului este legat de un pol, centromerul cromozomului omolog din bivalent este legat de polul opus. Cercetările electronmicroscopice au dus la constatarea că centromerul cromozomilor omologi în metafaza I şi anafaza I reprezintă de fapt o structură dublă şi se interpretează aceste imagini ca fiind doi centromeri fii, foarte strîns uniţi, care se vor separa abia în a doua diviziune meiotică fiind legaţi de poli diferiţi în metafaza II şi anafaza II.

Centromerul meiotic se deosebeşte de cel mitotic prin lipsa aşa-numitei constricţii, un punct îngust, caracteristic doar pentru cromozomul mitotic.

Pînă aici a durat profaza primei diviziuni meiotice — o fază lungă, în care, alături de esenţiale transformări morfologice, se realizează şi unele procese biochimice şi mai ales genetice de excepţională importanţă pentru recombinarea genetică la organismele eucariote, aşa cum este crossing-overul.

Metafaza I (M_I). Este faza în care dispare membrana nucleară şi apare fusul acromatic bipolar, spre al cărui ecuator se orientează bivalenţii. Perioada dintre dezintegrarea membranei nucleare şi localizarea bivalenţilor pe fus s-a numit prometafază. În metafaza I tipică, cei doi centromeri omologi ai fiecărei tetrade cromatidiale, sau bivalent, stau pe axa longitudinală a fusului în aşa fel încît ei sînt orientaţi fiecare spre un alt pol al fusului. Acesta este procesul de coorientare de mare importanţă în repartizarea echilibrată a cromozomilor spre poli.

În echilibru metafazic, cele două regiuni centrice ale bivalentului sînt echidistante faţă de placa ecuatorială. Distanţa de la centromer la placa ecuatorială este determinată de poziţia chiasmei proximale. Numărul şi poziţia chiasmelor alături de lungimea relativă a braţelor cromozomale, determină forma bivalentului în metafaza I (Fig. 102). Fibrele semifuzoriale sau cromozomale leagă regiunile centrice de cel mai apropiat pol. În formarea acestor fibre se pare că centromerul joacă un rol esenţial. Regiunea centrică este singura parte a cromozomului ataşată de fus. Fibrele cromozomale sînt responsabile pentru migrarea anafazică a cromozomilor. Deşi regiunea centrică a fiecărui omolog este dublu structurată, ea funcţionează ca o unitate, deoarece regiunile centrice ale bivalentului sînt reciproc orientate şi trec spre polii o-

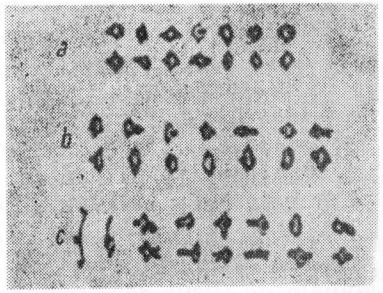


Fig. 102 — *Bivalenţi metafazici de Agropyron parishii* (a). *Elymus glaucus* (b) şi *Sitation jubatum* (c) la care se remarcă diferenţe în frecvenţa chiasmei pe bivalent (din Stebbins, 1971).

puși ai fusului de diviziune. În metafaza I respingerea centromerilor se accentuează, pregătind cromozomii pentru deplasare.

Anafaza I (A_I). În această fază are loc separarea fiecărei tetrade în doi cromozomi diadici odată cu deplasarea celor două regiuni centrice coorientate spre poli opuși. Pe cînd regiunile centrice încep să se deplaseze spre poli, chiasmele alunecă spre capetele cromozomilor omologi eliberîndu-le, dezangajînd astfel omologii împerecheați. De acum, fiecare cromozom se prezintă, în funcție de poziția centromerului său, ca o structură cu două sau cu patru brațe, capetele cromatidelor fiind divergente. Cînd centromerul este median, cromozomul metacentric apare ca un dublu „V". Cînd cromozomul este acrocentric, apare ca un dublu „I". Cromozomul telocentric apare sub forma unui singur „V". Deși fiecare omolog constă din două cromatide, regiunea centrică funcționează ca o unitate, A fiind reducțională pentru regiunea centromerică. Lima de-Faria a arătat că în această fază totuși, regiunea centrică este dublă, dar starea nedivizată a cromatidei adiacente centromerului reunește împreună cele două cromatide surori (Rhoades, 1961).

În A_I, regiunea centrică suferă, cu toate acestea, o segregare reducțională — fapt demonstrat de McClintock la separarea anafazică a perechii heteromorfe de cromozomi la porumb. În cazul acestei perechi, un cromozom este telocentric, avînd doar un singur braț scurt, celălalt cromozom al perechii heteromorfe prezintă un braț scurt și altul lung. Dacă A_I ar fi ecuațională pentru regiunea centrică, fiecare diadă cromozomală ar avea două brațe scurte și un braț lung. Dar are loc în A o segregare reducțională, deoarece se remarcă faptul că o diadă ce migrează spre un pol are două brațe scurte (corespunzător cromozomului telocentric cu braț scurt), pe cînd diada care migrează spre polul opus are două brațe scurte și două lungi (corespunzător cromozomului heteromorf cu un braț scurt și altul lung). Cu alte cuvinte, în A , centromerul nu se divide în centromeri fii care să migreze spre poli opuși. În felul acesta în A_I se realizează reducerea efectivă a numărului diploid de cromozomi, numărul de cromozomi diadici la fiecare pol fiind pe jumătate din numărul diploid de cromozomi.

Fiecare bivalent este alcătuit din două cromatide de origine maternă și două de origine paternă. Orientarea tetradelor cromozomale pe fusul de diviziune, în metafaza I, este randomizată. Are loc o segregare independentă a cromozomilor diferitelor perechi care, alături de fenomenul de crossing-over, duce la realizarea recombinării genetice. Niilo Virkki (1968) descrie o interesantă segregare anafazică în prima diviziune meiotică la cromozomii de sex,

asinaptici, de la masculul de Asphaera daniela (Coleoptera, Alticidae). Aici este vorba de 7 cromozomi de sex, asinaptici și anume un X și 6 cromozomi Y (Y_1—Y_6). Autozomii formează 10 bivalenți. În placa metafazică se dispun 10 bivalenți $+X+Y_1+Y_2+Y_3+Y_4+Y_5+Y_6$. Dar în ciuda asinapsiei heterozomilor segregarea este totteauna regulată: 10 autozomi + cromozomul X migrează spre un pol și 10 autozomi și cromozomii $Y_1 + Y_2 + Y_3 + Y_4 + Y_5 + Y_6$ spre polul opus. Această recombinare genetică este amplificată în meioză de faptul că, în urma schimbului reciproc de fragmente de cromozomi omologi, fiecare cromatidă implicată în schimb va conține, după efectuarea acestuia, atît material genetic de origine maternă cît și material genetic de origine paternă. Avem astfel imaginea posibilităților vaste de realizare a recombinării genetice la eucariote și a importanței meiozei în acest proces.

Anafaza I-a duce la separarea celor două cromatide materne la un pol și a celor două cromatide paterne la polul opus. Acesta este fenomenul de prereducere. În anafaza a II-a, are loc postreducerea, în cazul căreia spre poli migrează doar cîte o cromatidă de origine maternă și cîte o cromatidă de origine paternă, din fiecare cromozom corespunzător, avînd astfel loc și disocierea, segregarea caracterelor ce provin de la fiecare părinte.

Telofaza I (T_I). Cromozomii sub formă de diadă cromozomală ajung la poli. Ca atare, la fiecare pol ajunge un număr haploid de cromozomi datorită segregării centromerice reducționale în A_I (nesepararea centromerului fiecărui omolog în centromeri fii). Prima diviziune meiotică este din această cauză reducțională. La fiecare pol se formează nucleul telofazic cu membrană nucleară și nucleol. În nucleii telofazici (T), cromozomii materni și paterni sînt repartizați independent unii față de alții. Cromozomii telofazici din T_I suferă modificări caracteristice telofazei mitotice. Ei se despiralizează și trec într-o scurtă interfază rămînînd uneori sub formă de structuri filiforme sau își pierd (probabil microscopic) individualitatea. În unele cazuri, precum la Trillium și Odonate, telofaza I și interfaza sînt omise, grupul anafazic de diade cromozomale intrînd în a doua diviziune cu mici modificări sau fără modificări în lungimea cromozomilor sau în spiralizarea lor.

De obicei interfaza dintre prima și a doua diviziune meiotică este scurtă. În ea nu se produce replicarea ADN-ului din care cauză se explică și lipsa acestei interfaze la unele organisme. La sfîrșitul T_I începe citochineza, apărînd, precum la porumb și alte plante, un perete celular între cei doi nuclei telofazici, divizînd celula mamă în două celule fiice (bipartiție), dar la alte organisme citochineza are loc la sfîrșitul ambelor diviziuni meiotice (cvadri-

partiție). Telofaza I este corespunzătoare diadei, pe cînd telofaza celei de a doua diviziuni meiotice este corespunzătoare tetradei.

Prima diviziune meiotică se încheie astfel cu formarea a doi nuclei fii haploizi. Ea este în consecință reducțională sau heterotipică, căci pornindu-se de la un anumit tip de celulă — de exemplu diploid — se ajunge la nașterea a două celule de alt tip și anume cu număr de cromozomi redus la jumătate — adică haploide. Acestei prime diviziunii meiotice îi urmează o a doua diviziune meiotică numită ecvațională sau de maturație și care se desfășoară după tipul unei mitoze obișnuite. Diviziunea meiotică, în ansamblu, trebuie privită ca un proces unitar cu desfășurare continuă și stadială și cu întrepătrundere de procese mai ales la nivel molecular. Pentru meioza II este caracteristică dedublarea foarte timpurie a cromatidelor surori realizată deja în profaza I, pe cînd dedublarea centromerului se realizează în metafaza II. Din această cauză în meioza tipică, reproducerea cromozomilor și a centromerilor sînt fenomene decalate în timp. Dar cele două diviziuni meiotice reprezintă un proces unic prin desfășurarea sa unitară și prin intercondiționarea lor.

b) *A DOUA DIVIZIUNE MEIOTICĂ*

În comparație cu prima diviziune meiotică, cea de a doua diviziune meiotică (Fig. 103), desfășurîndu-se aparent după tipul unei mitoze obișnuite este mai puțin spectaculoasă. Deosebirea esențială între a doua diviziune meiotică și mitoza propriu-zisă constă în aceea că, împărțirea fiecărui cromozom în cromatide a preexistat în toată prima diviziune meiotică și se moștenește direct de la acesta, pe cînd în cazul mitozei, ea s-a produs în cursul interfazei recente, ce precede diviziunea în sine. De asemenea cromatidele cromozomilor în a doua diviziune meiotică, fiind un mozaic de material genetic matern și patern, se deosebesc de cromatidele cromozomilor din mitoza tipică. Crossing-overul, realizat în prima diviziune meiotică reprezintă baza materială a recombinării genetice și a realizării acestui mozaic.

În profaza a II-a cele două cromatide ale fiecărei diade cromozomale (cromozom) au aspect de „X" fiind unite de o regiune centromerică comună. Cele patru brațe sînt larg îndepărtate. Ele nu sînt reciproc încolăcite. Diadele în formă de „X" sînt de cîteva ori mai lungi decît în T_I , dar cromonemele nu sînt complet despiralizate. Constituția genetică a celor două cromatide ale fiecărei diade cromozomale (cromozom) depinde de felul și numărul crossing-

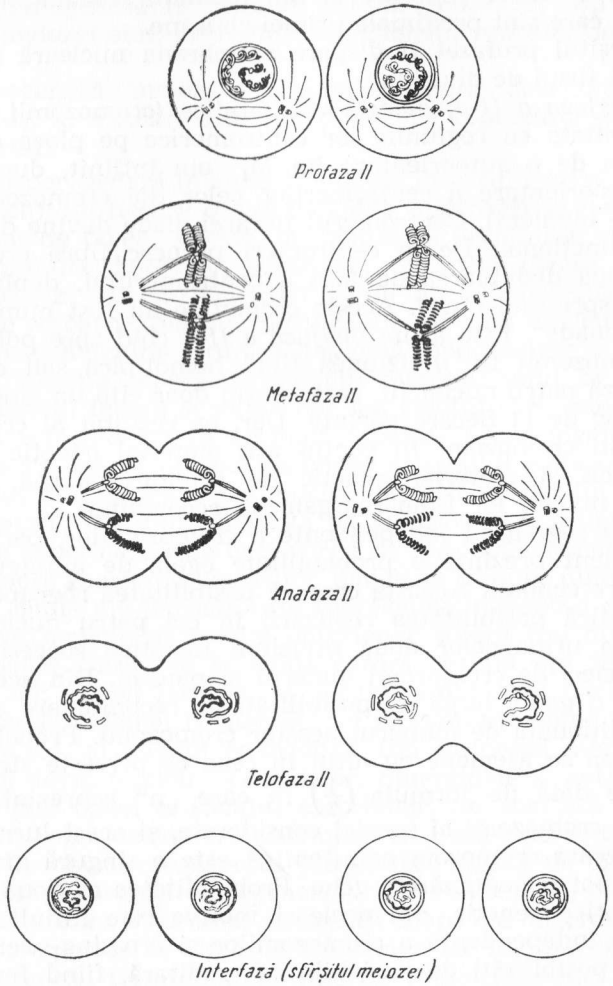


Fig. 103 — *Desfășurarea celei de a doua diviziuni meiotice* (din G. S. Stent, 1971).

overelor ce au avut loc în P_I . Dacă nu a avut loc crossing-overul, diada va fi formată din două cromatide surori identice fie de origine maternă, fie de origine paternă. Dacă a avut loc crossing-overul, fiecare cromatidă va avea segmente derivate de la ambii cromozomi parentali. Singurele regiuni invariabile, compuse din segmente de

la cromatide surori, sînt acelea din imediata vecinătate a centromerului și care sînt proximale primei chiasme.

La sfîrșitul profazei II dispare membrana nucleară și apare în citoplasmă fusul de diviziune.

În metafaza a II-a, diadele cromatidice (cromozomii univalenți) devin orientate cu regiunile lor centromerice pe placa ecuatorială. Este vorba de o autoorientare (în M_I am întîlnit, după cum am văzut, o coorientare a centromerilor celor doi cromozomi omologi din fiecare bivalent). Centromerul fiecărei diade devine dublu structural și funcțional. De la centromeri pornesc fibre cromozomale. Începe, după dedublarea de fapt a centromerului, deplasarea cromatidelor spre poli opuși. Aceste cromatide au fost numite de unii autori „monade". Este acum *anafaza a II-a* cînd spre poli se deplasează cromozomii fii, diviziunea fiind homotipică sau ecvațională. Se formează patru nuclei fii, care conțin doar cîte un singur cromozom omolog de la fiecare părinte. Dar, ca rezultat al crossing-overului, acești cromozomi fii conțin atît material genetic de origine maternă, cît și material genetic de origine paternă, materialul genetic la nivelul lor fiind reorganizat, recombinat.

Pe baza segregării independente a cromozomilor, partenerii fiecărui bivalent prezintă o probabilitate egală de a migra spre un pol sau spre celălalt. Aceasta creează posibilitatea regrupării cromozomilor, adică posibilitatea realizării în cei patru nuclei haploizi, rezultați în urma celor două diviziuni meiotice succesive a diferitelor asocieri de cromozomi materni și paterni. Din această cauză se creează o gamă largă de posibilități de recombinare a cromozomilor condiționată de numărul acestor cromozomi. Probabilitatea ca un gamet să se asemene cu altul în ceea ce privește structura genetică este dată de formula $\left(\frac{1}{2}\right)$ în care „n" reprezintă numărul haploid de cromozomi ai speciei considerate, și acest lucru, în cazul cînd pe fiecare cromozom admitem că este o singură genă, dar pe cromozom pot fi nenumărate gene. Probabilitatea ca două organisme să fie identice genetic, din aceleași motive este infinit mai mică. Segregarea independentă a cromozomilor și crossing-overul asigură nelimitate posibilități de variabilitate ereditară, fiind fenomene de importanță primordială în evoluția organismelor eucariote. W. S. Sutton, la 1903, descoperă faptul că gameții, rezultat al diviziunii meiotice, prezintă o multitudine de posibilități de combinare a cromozomilor paterni și materni.

În telofaza a II-a, cromozomii își pierd individualitatea la nivelul celor patru nuclei fii haploizi. Spre sfîrșitul ei, se individualizează patru celule haploide care alcătuiesc o tetradă. Fiecare celulă a tetradei devine un gamet.

În spermatogeneză (meioza la animale mascule) toți cei patru produși ai meiozei sînt, de regulă, funcționali, reprezentînd spermatozoizii.

În ovogeneză (meioza la animale femele) doar unul din cei patru produși ai meiozei este funcțional. El reprezintă gametul femel sau ovulul.

În microsporogeneză (meioza la plante, în cazul genezei grăuncior de polen) din fiecare celulă haploidă a tetradei se formează cîte un grăuncior de polen. Acesta, în momentul germinării suferă două diviziuni mitotice haploide, succesive, în urma cărora rezultă în prima etapă, un nucleu generativ și un nucleu vegetativ. Nucleul vegetativ se resoarbe, degenerînd picnotic, pe cînd nucleul generativ suferă a doua diviziune mitotică haploidă dînd naștere la doi nuclei spermatici. Aceștia reprezintă gameții masculi: unul se va uni cu oosfera (gametul femel) și va da oul sau zigotul care este diploid — fecundarea refăcînd starea normală diploidă a organismului — iar al doilea se va uni cu nucleul secundar al sacului embrionar (acesta este rezultat din unirea a doi nuclei haploizi ai sacului embrionar din care cauză este diploid) și va da endospermul primar triploid. La plantele superioare este deci vorba de o dublă fecundare. În macrosporogeneză (nașterea gameților femeli la plante) numai una din cele patru celule ale tetradei este funcțională, devenind sac embrionar. Nucleul haploid al sacului embrionar suferă trei diviziuni mitotice haploide succesive în urma cărora rezultă opt nuclei. Unul din acești opt nuclei haploizi ai sacului embrionar devine nucleul oosferei (gametul femel la plante), doi se contopesc dînd nucleul secundar, diploid, al sacului embrionar, trei formează nucleii antipodelor și doi devin nucleii sinergidelor. Sinergidele și antipodele sînt așezate la poli opuși ai sacului embrionar. Se constată că nu sînt deosebiri în repartizarea cromozomilor în macrosporocite și microsporocite. De obicei megasporul plasat spre șalază va da sacul embrionar, ceilalți megaspori degenerînd. La Poa alpina, macro și microsporocitele intră în profază în același timp. Dar macrosporogeneza și microsporogeneza se defășoară ulterior cu un oarecare decalaj, microsporogeneza terminîndu-se mai devreme. Este aici o adaptare spre a evita autopolenizarea. La plante ce se reproduc sexuat, procesul formării gametofitului femel cuprinde următoarele etape:

— diferențierea macrosporofitului din archespor;

— meioza care duce la nașterea a patru macrospori reduși, unul evoluînd spre celula mamă a sacului embrionar;

— formarea gametofitului în urma cîtorva diviziuni mitotice la nivelul nucleului haploid al celulei mamă a sacului embrionar.

Fiecare din aceste etape este controlată de gene sau grupe de gene care determină locul, timpul și desfășurarea proceselor atît de complexe ale macrosporogenezei.

Condițiile meiozei

1. prezența complexului sinaptinemal; 2. posibila împerechere premeiotică a cromozomilor; 3. sinapsisul omologilor; 4. crossing-overul; 5. prezența nodului sinizetic sau a buchetului (prinderea cromozomilor, prin telomere, de membrana nucleară într-o regiune specifică acesteia); 6. existența adevăratelor cromomere (din leptoten pînă în pachiten); 7. posibila inexistență a fazei G_2 a ciclului celular (deoarece sinteza replicativă a ADN-ului se extinde în profază meiotică); 9. spiralizarea cromozomilor. Toate aceste procese sînt interconectate și fac din meioză o variantă posibilă a mitozei. Funcția primară a meiozei este recombinarea genetică.

2. MODIFICĂRI ÎN DESFĂȘURAREA NORMALĂ A MEIOZEI ȘI MECANISMELE LOR GENETICE

La numeroase organisme, în meioză, apar modificări ce se abat de la desfășurarea normală a sa. Aceste modificări pot fi neesențiale sau profunde și sînt determinate de particularitățile fiziologice, ecologice și mai ales de organizare genetică ale acestor organisme.

După desfășurarea fenomenelor sinaptice și a comportamentului cromozomal în meioză, Battaglia (1964) a deosebit trei tipuri de meioză: eumeioză, pseudomeioză și parameioză.

În cazul *eumeiozei,* desfășurarea fenomenelor sinaptice este normală, avînd loc conjugarea deplină a omologilor spre a se forma bivalenți. Separarea anafazică a cromozomilor în prima diviziune meiotică este reducțională, spre poli migrînd cromozomii alcătuiți din două cromatide surori. Aceasta se desfășoară după tipul prereducerii, datorită coorientării centromerilor în M_I.

În cazul *pseudomeiozei,* meioza se desfășoară fără sinapsis sau chiasmele apar precoce și dispar în profaza I. Din această cauză, în prima diviziune meiotică, apar doar univalenți, meioza devenind de fapt mitoză, nucleele rezultate în urma primei diviziuni meiotice fiind diploide. Dacă acestei prime diviziuni meiotice ecvaționale, fără conjugare de cromozomi omologi, îi urmează o interchineză în care nu are loc sinteza de ADN și deci nici reproducerea cromozomilor, a doua diviziune meiotică poate fi reducțională; dacă are loc duplicarea cromozomilor și a doua diviziune este mitotică ecvațională. Meioza achiasmatică caracterizează diferite grupe de insecte și grupe de organisme unisexuate desfășurîndu-se după tipul postreducerii. La o mutantă asinaptică de Triticum durum, L. F. La Cour și B. Wells (1970) au remarcat absența completă a zigotenului și pachitenului. Cromozomii trec prin condiția normală cromomerală din leptoten și rămîn neîmperecheați în profază. La microscopul electronic s-a constatat absența complexelor sinaptinemale.

Nu același lucru se întîmplă în cazul desinapsiei în care, cu toate că se ajunge la același rezultat, cromozomii trec prin zigoten și pachiten dar în final nu se formează bivalenți. Aceste anomalii după Riley (1959) și Laws (1967) sînt controlate genetic.

În cazul *parameiozei* apar treceri de la eumeioză la pseudomeioză, fiind caracterizată de asinapsie parțială. Se poate desfășura după tipul prereducerii (reducerea numărului de cromozomi în prima diviziune meiotică) sau postreducerii (reducerea numărului de cromozomi în a doua diviziune meiotică).

Cînd nu are loc reproducerea cromozomilor și centromerilor se desfășoară un tip de meioză particulară, realizată într-o singură diviziune. În acest caz, conjugarea cromozonilor omologi este slab exprimată sau nu are loc, centromerii cromozomilor omologi dispunîndu-se la o anumită distanță pe placa ecuatorială, paralel cu axa de diviziune, încît în anafază cromozomii se repartizează în mod egal spre polii opuși, avînd loc o reducere corectă a numărului lor. Deoarece este exclus stadiul de tetradă cromozomală, nu are loc formarea chiasmelor și crossing-overul. Meioza desfășurată într-o singură diviziune a nucleului este caracteristică unor protozoare. Meioza unistadială, desfășurată fără realizarea crossing-overului, reduce posibilitățile evolutive ale acestor organisme, diminuînd mult posibilitatea recombinării genetice.

Tipuri modificate de meioză apar la Sciaridae și Cecidomydae. În general, cele mai multe modificări apar în spermatogeneză. Tipurile anormale de meioză au la bază existența unor modificări în structura materialului genetic, datorîndu-se unor mutații. La lăcustă, în spermatogeneză (masculii sînt XO) cromozomul X este neîmperecheat în M_I. Trecerea lui precoce spre un pol în A_I este controlată genetic, printr-un mecanism diferit de acela care determină disjuncția autozomilor înperecheați. În a doua diviziune meiotică are loc diviziunea ecvațională a diadei X. Din cele patru spermatide două au cîte un cromozom X iar două nu au cromozom X. Chiar la spermatocitele tetraploide s-a constatat că cei doi cromozomi X nu se împerechează în metafază, iar în A_I ei segregă reducțional.

În spermatogeneza masculilor haploizi de himenoptere, toți cromozomii rămîn neîmperecheați. Toți cromozomii sînt incluși într-un singur nucleu și suferă o diviziune ecvațională în A_I . Acest comportament meiotic al cromozomilor la masculii haploizi este determinat genetic, deoarece s-a constatat că la masculii diploizi de Habrobracon, comportamentul meiotic este identic cu acela de la masculii haploizi.

Și spermatogeneza la Drosofila este anormală căci în ea nu apare crossing-overul, cromozomi X și Y neîmperechindu-se niciodată dar separîndu-se la poli opuși în A_I.

La Drosophila pseudoobscura și alte specii ce prezintă rase cu „sex-ratio" determinate genetic, în urma încrucișării femelelor normale cu masculi, cu condiția „sex ratio", în loc să apară raportul de sexe 1 : 1, apare un procent ridicat de femele. Cromozomii X și Y nu se împerechează. În timp ce cromozomul X se divide ecvațional în fiecare diviziune meiotică, așa încît fiecare spermatidă primește cîte un cromozom X, cromozomul Y în mod obișnuit degenerează. În acest fel se explică modificarea raportului dintre sexe, adică prin existența unui număr mult mai mare de gameți masculi tip X, comparativ cu gameții masculi de tip Y din a căror unire cu ovule (care sînt numai de tip X) ar da indivizi masculi XY.

La Drosophila affinis, condiția „sex-ratio", care în mod normal produce aproape întreaga descendență femelă, a fost modificată de o mutație recesivă autozomală. Masculii homozigoți pentru această mutație recesivă și purtători ai „sex-ratio-ului", aveau o descendență în care predominau masculii față de femele. Orientarea omologilor din bivalent față de polii fusului ca și orientarea diferitelor perechi de cromozomi, una în raport cu alta, este realizată pe bază de hazard, făcînd astfel posibilă valabilitatea legii segregării independente a cromozomilor din diferite perechi de cromozomi.

Uneori se remarcă însă o segregare preferențială a unui anumit cromozom spre un anumit pol. O asemenea segregare preferențială se realizează în cazul pronucleului ovulului funcțional în ovogeneză și a megasporului care va deveni funcțional și va evolua spre sacul embrionar. Dar acest cromozom ce se distribuie preferențial va fi prezent la mai mult de jumătate din descendență. Includerea preferențială a unui anumit cromozom în gameți a fost numită de către Sandler și Novitski „meiotic drive" și condiția „sex-ratio" reprezintă un caz în care se realizează o asemenea „comandă meiotică" (Rhoades, 1961).

Cînd are loc segregarea preferențială simultană a două perechi de cromozomi nu este afectată asortarea lor independentă. Segregarea preferențială a unui cromozom într-un anumit nucleu haploid, în ovogeneza la Drosofila, s-a constatat că are la bază diversitatea structurală a cromozomilor omologi ai unei perechi. Astfel Novitski a constatat că la Drosofilă cromozomul mai scurt, al unei perechi heteromorfice de cromozomi omologi, a fost preferențial inclus în nucleul ovulului.

La Sciara, la care ovogeneza decurge normal, spermatogeneza se realizează fără împerechere, deci fără crossing-over. În locul fusului bipolar apare un fus unipolar. Spre acest unic pol se deplasează cromozomii materni pe cînd cei paterni, deși legați de același pol prin fibre cromozomale, trec în direcție opusă, dînd un nucleu care degenerează, spermatocita secundară avînd doar cromozomi materni. În a doua diviziune meiotică ambele cromatide ale cromozomului X (diada) trec precoce și preferențial spre același pol. Rezultă un nucleu cu doi cromozomi X, care va deveni nucleul spermatidei. Celălalt nucleu, care n-a primit nici o cromatidă X, degenerează. Din această cauză se produce un singur spermatozoid normal, deci un singur produs funcțional al meiozei mascule, ca în ovogeneză.

La formele cu centromeri nelocalizați, sau difuzi, la care cromatidele sînt structuri autonome și independente, în A_I se deplasează spre poli două cîte două cromatide complet separate. În anafază fiecare cromatidă poate fi considerată un cromozom întreg la fiecare nucleu din telofaza I merge un număr neredus de cromozomi.

Dar în a doua diviziune meiotică apare o reasociere, o împerechere secundară în interfaza dintre cele două diviziuni meiotice și astfel, reducerea numărului de cromozomi se realizează în a doua diviziune meiotică (postreducere).

Caracterul reducțional sau ecvațional al segregării este în funcție de orientarea pe fus a celor doi cromozomi omologi. Cînd cromozomii din bivalent se orientează independent (autoorientare) segregarea este ecvațională. Dacă omologii sînt coorientați, segregarea este reducțională. Cu excepția Odonatelor, formele cu cromozomi ce prezintă centromeri localizați au bivalenții coorientați în M_I. La Sphagnum, se întîlnește un caz aparte. La început coorientați în M_I, bivalenții devin ulterior autoorientați, avînd loc o diviziune precoce a centromerului.

La majoritatea formelor cu centromeri nelocalizați, prima diviziune meiotică este ecuațională, iar a doua reducțională, deoarece în M_I se înregistrează o autoorientare a centromerilor iar în M_{II} apare coorientarea centromerilor, inversîndu-se astfel secvența normală a meiozei.

La Luzula purpurea, Malheiros a remarcat prezența centromerilor nelocalizați și autoorientarea bivalenților în M_I. În cazul speciilor genului Luzula, meioza este neregulată. În a doua diviziune meiotică are loc o nouă conjugare a cromozomilor. Dar au loc, atît în prima cît și în a doua diviziune meiotică, fragmentări ale bivalenților. Meioza în acest caz se efectuează după tipul postreducerii, ducînd la modificarea structurii și numărului cromozomilor. Cînd capetele rupte ale hemicromatidelor omoloage, produse prin fragmentarea cromatidelor anafazice, nu fuzionează și se separă, rezultînd două corpuri cromozomale distincte, se realizează poliploidia endonucleară sau agmatoploidia.

Și la genul Thyanta, dintre hemiptere, datorită aceluiași caracter morfologic al cromozomilor cu centromeri difuzi se înregistrează un comportament meiotic asemănător celui de la Luzula.

Un tip particular de meioză a fost descris de către Hughes Schrader la Llaveia bouvari. La această specie nucleul profazic devine lobat cu fiecare bivalent sau univalent (în cazul asinapsisului) izolat într-o veziculă separată. Fusul de diviziune este alcătuit din fusuri individuale, paralel aliniate, formate de fiecare unitate cromozomală. Perechile mai scurte de cromozomi prezintă asinapsis. Cromozomii neîmperecheați segregă ecvațional în prima diviziune, iar în a doua diviziune meiotică are loc împerecherea cromatidelor omoloage.

3. MEIOZA ÎN CONDIȚIILE VARIAȚIEI NUMĂRULUI DE CROMOZOMI

Tipul normal de meioză, descris la organismele diploide, presupune împerecherea a doi cîte doi cromozomi omologi în cadrul fenomenelor sinaptice din profraza I. Această împerechere a doi cîte doi cromozomi omologi are la bază prezența, în complementul cromozomal al organismelor diploide, a două seturi de cromozomi, unul de origine maternă iar altul de origine paternă, aduse de gameți la nivelul zigotului, rezultat în urma fecundării. Cîte un cromozom din setul matern este omolog cu cîte un cromozom din setul patern de cromozomi.

Doi cîte doi cromozomi omologi conjugă în profaza I.

Este de așteptat ca în condițiile variației numărului de cromozomi, variație care pornește de la mici modificări, numerice în cazul aneuploidiei, ajungînd să afecteze întreaga garnitură de cromozomi în cazul haploidiei și poliploidiei, meioza să se desfășoare cu anumite abateri de la normă.

a. *DESFĂȘURAREA MEIOZEI LA ORGANISMELE HAPLOIDE*

Multe organisme, în special cele inferioare cum ar fi bacteriile, algele unicelulare și ciupercile sporogene, există ca organisme haploide. Chiar unele nevertebrate precum insectele himenoptere (albina, viespea) prezintă în mod natural haploidia la masculi. Rotiferii și afidele de asemenea prezintă specii haploide. Apariția haploidiei la insecte himenoptere este urmarea firească a partenogenezei, masculii dezvoltîndu-se din ouă nefecundate. Dar haploidia = monoploidia, poate fi obținută și pe cale experimentală, formele monoploide = haploide prezentînd în anumite cazuri însușiri extrem de prețioase, în primul rînd o constituție genetică pură care, prin diploidizare, în urma colchicinizării, dau forme uniforme, izogene. La organismele normal diploide, condiția haploidă este o stare heteroploidă și această haploidie heteroploidă determină o înaltă sterilitate, datorită neîmperecherii cromozomilor în meioză. Ocazional pot să apară bivalenți pe seama duplicației segmentelor genomului. Probabilitatea ca un haploid veritabil să producă gameți viabili, cu număr echilibrat de cromozomi, depinde de numărul de bază de cromozomi: un număr mai mic face mai mare probabilitatea ca toți cromozomii să meargă la același pol. De exemplu, probabilitatea pentru Haplopapus gracilis haploid ($n = 2$) să producă gameți viabili este $\left(\frac{1}{2}\right)^n$. Frecvența gameților viabili va fi 1/4 iar fertilitatea gameților în jur de 25%. O specie cu trei perechi de cromozomi ar produce doar 12,5% gameți viabili, iar una cu $n = 4$ ar avea o fertilitate de cca. 6,25%.

Formele haploide constituie un important obiectiv în lucrările de ameliorare, căci reduc foarte mult eforturile de obținere a liniilor consangvinizate. Cromozomii, la formele haploide fiind reprezentanții unui singur set, neavînd fiecare perechea sa, nu pot conjuga în timpul meiozei (Fig. 104). În prima diviziune meiotică, cromozomii se repartizează toți la un singur pol al fusului, fără să cliveze. Celula care nu a primit cromozomi degenerează. La trîntorul de albine, în a doua diviziune meiotică, care se desfășoară după tipul mitozei obișnuite, fiind ecvațională, se formează două celule care prezintă dimensiuni diferite: una este mai mare și se transformă în spermatozoid funcțional, iar alta este mai mică și degenerează.

Și la plantele superioare a fost remarcată haploidia apărută spontan sau indusă experimental. Din formele diploide provin monohaploizii pe cînd din formele poliploide provin polihaploizii. Conjugarea cromozomilor este exclusă la monohaploizi, lipsind cro-cromozomii omologi, așa cum s-a remarcat la Lycopersicum esculen-

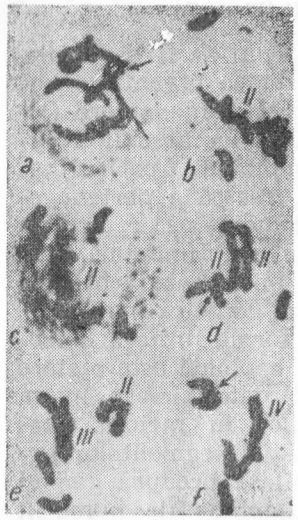


Fig. 104 — *Desfășurarea meiozei la secara haploidă.* *a* — profaza cu 7 univalenți și nucleol (săgeata indică asocierea prin capete ia unvalenților end to end). *b—f* — diferite asocieri ale cromozomilor setului haploid. II — bivalenți; III — trivalenți; IV — tetravalenți; *d* — trei asociații de univalenți din care aceea indicată cu săgeată prezintă un raport centromer—capăt. (centromer-end) (din Konstantinov, 1971).

tum, Nicotiana glutinosa, Zea mays etc. Uneori chiar la monohaploizi se remarcă conjugarea cromozomilor, e drept limitată la anumiți cromozomi. De exemplu, Levan a descris la Secale cereale forma haploidă cu n = 7, formarea a doi bivalenți, iar Riger a constatat o frecvență a conjugării cromozomilor de 57,6% la formele haploide de Antirrhinum sp. (n = 8).

La orezul haploid s-a observat că în diachineză și metafaza I se formează 13 tipuri diferite de asociații, în funcție de afinitățile relative și poziția relativă a cromozomilor setului haploid. Asemenea asocieri la nivelul complementului haploid indică prezența segmentelor omoloage aparținînd la diferiți cromozomi și posibila origine poliploidă a unor asemenea organisme.

Conjugarea cromozomilor la formele haploide are o deosebită semnificație genetică, demonstrînd fie prezența omologiei cromozomale la nivelul garniturii de bază de cromozomi (indicînd astfel gradul de înrudire a diferitelor specii cărora le putem stabili originea), fie prezența aberațiilor cromozomale (în special duplicațiile) la nivelul setului haploid. Studiul conjugării cromozomilor la formele haploide trebuie făcut cu mare atenție pentru a se putea face distincție între conjugarea propriu-zisă și așa-numitele asocieri secundare ale părților neomoloage ale cromozomilor setului haploid, asociere care imită numai conjugarea. Apoi cromozomii se pot uni prin alipire. Asocierea cromozomilor la formele haploide duce la formarea de falși bivalenți, achiasmatici, care nu presupune apariția crossing-overului, deși sînt unele păreri care admit și acest fenomen la nivelul haploizilor.

Cercetările lui S. S. Chase (1969), efectuate de monoploizii de porumb care au 10 cromozomi, au arătat că în meioză nu apare sinapsisul sau crossing-overul. Diadele cromozomale rămîn împreună în prima diviziune meiotică pentru a se divide ecvațional în a doua diviziune meiotică. Microsporii și megasporii primesc adesea un set incomplet de cromozomi, monoploizii, fiind complet sterili. Cromo-

zomii leptotenici sînt clar dubli. Uneori, unii univalenți pot da false asociații bivalente. Lipsește adesea placa metafazică. Un nucleu de restituție înglobează toți cei 10 cromozomi. Cînd cromozomii monoploidului nu se repartizează toți într-un nucleu, dacă se formează doi nuclei, nici unul dintre ei nu are setul haploid complet de cromozomi.

La polihaploizi există posibilitatea conjugării cromozomilor, mai ales la autopolihaploizi, datorită prezenței cromozomilor omologi (de fapt autopolihaploizii sînt forme diploide). Dar și în aceste condiții meioza poate să nu decurgă normal. Asocierile dintre cromozomi pot fi de tip latură pe latură (side-by-side), cap la cap (end-to-end) sau combinat (end-to-side).

La Sorghum, forma haploidă, asociațiile secundare rezultă din fuzionarea regiunilor heterocromatice. Dacă în interiorul setului haploid apar afinități de împerechere cu formarea de bivalenți chiasmatici, se pot trage concluzii asupra modificărilor privind duplicația materialului genetic. În descendența hoploizilor (V. R. Reddi, 1968) se evidențiază translocații, ceea ce înseamnă că a avut loc schimb de material genetic. Formarea bivalenților chiasmatici duce la apariția formelor trisomice. Asocierile cromozomale de tip end-to-end, după Riley și Chapman, nu depind de afinitatea structurală a cromozomilor (așa cum se întîmplă în cazul asocierii side-by-side), ci se realizează pe seama alipirii zonelor heterocromatice terminale. Absența fusului de diviziune sau dereglări în funcționarea normală a cromozomilor la formele polihaploide determină repartizarea neechilibrată a cromozomilor în meioză. Tipul normal de meioză cu conjugarea cromozomilor omologi este singurul care asigură o repartizare echilibrată a cromozomilor meiotici și duce la nașterea de gameți normali, haploizi.

b. *DESFĂȘURAREA MEIOZEI LA FORMELE POLIPLOIDE*

Poliploidia reprezintă o mutație genomică. Ea duce la mărirea, de un anumit număr de ori, a setului haploid de cromozomi sau a numărului de bază de cromozomi. Multiplicarea garniturii de bază de cromozomi se realizează fie pe seama propriei garnituri de cromozomi a speciei respective, în cazul *autopoliploidiei* (sub acțiunea diferiților factori fizici sau chimici, care afectează în special fusul de diviziune, blocînd formarea sa și repartizarea cromozomilor fii spre poli, fie pe seama garniturilor diploide, ce aparțin la două specii diferite și care prin încrucișare dau hibrizi interspecifici în cazul *allopoliploidiei*. Variația numărului de cromozomi poate să nu afecteze întreaga garnitură de cromozomi, ci numai anumite pe-

rechi din cromozomi din setul diploid, și acest fenomen este cunoscut sub numele de *aneuploidie*.

Cînd variația numărului de cromozomi nu este însoțită de o variație corespunzătoare a cantității de ADN, este vorba de fenomenul pseudopoliploidiei.

În toate aceste cazuri ale variației numărului de cromozomi, meioza se desfășoară cu abateri de la modelul tipic.

La autopoliploizi, deoarece prin multiplicarea garniturii de cromozomi pe seama seturilor haploide ale speciei considerate, numărul de cromozomi omologi crește au loc asocieri multiple de cromozomi în conjugarea sinaptică, cu formare de multivalenți (Fig. 105, a-w).

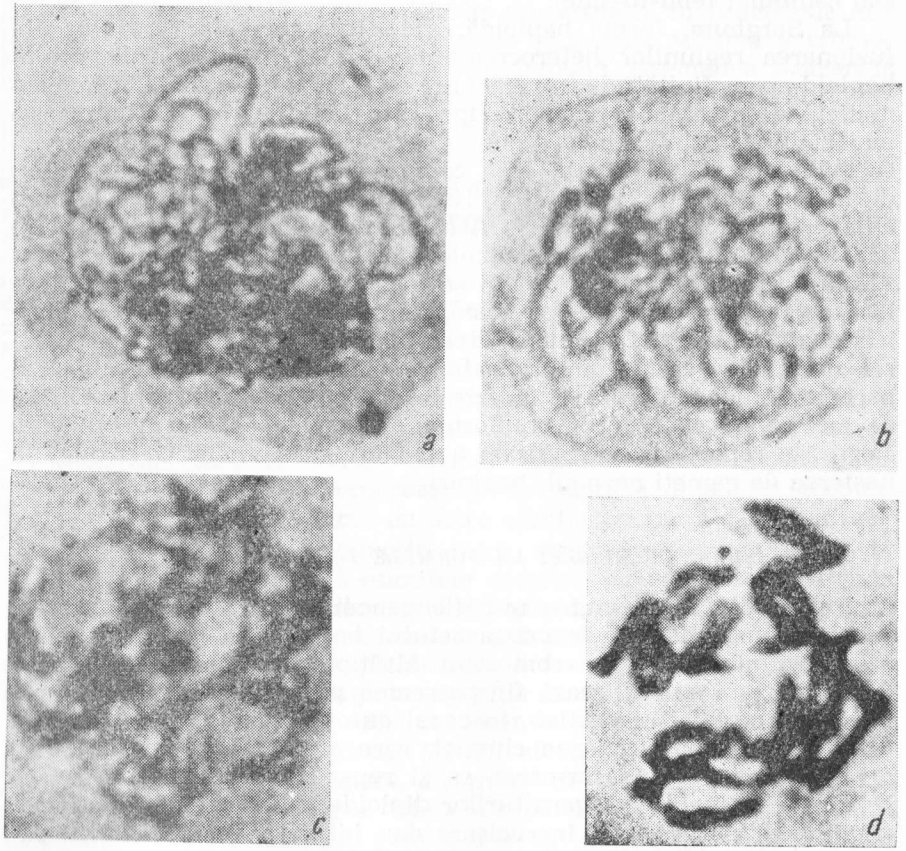


Fig. 105 — *Faze ale diviziunii meiotice la secara autotetraploidă* (original). *a* — leptoten; *b* — zigoten; *c* — pachiten; *d* — diploten;

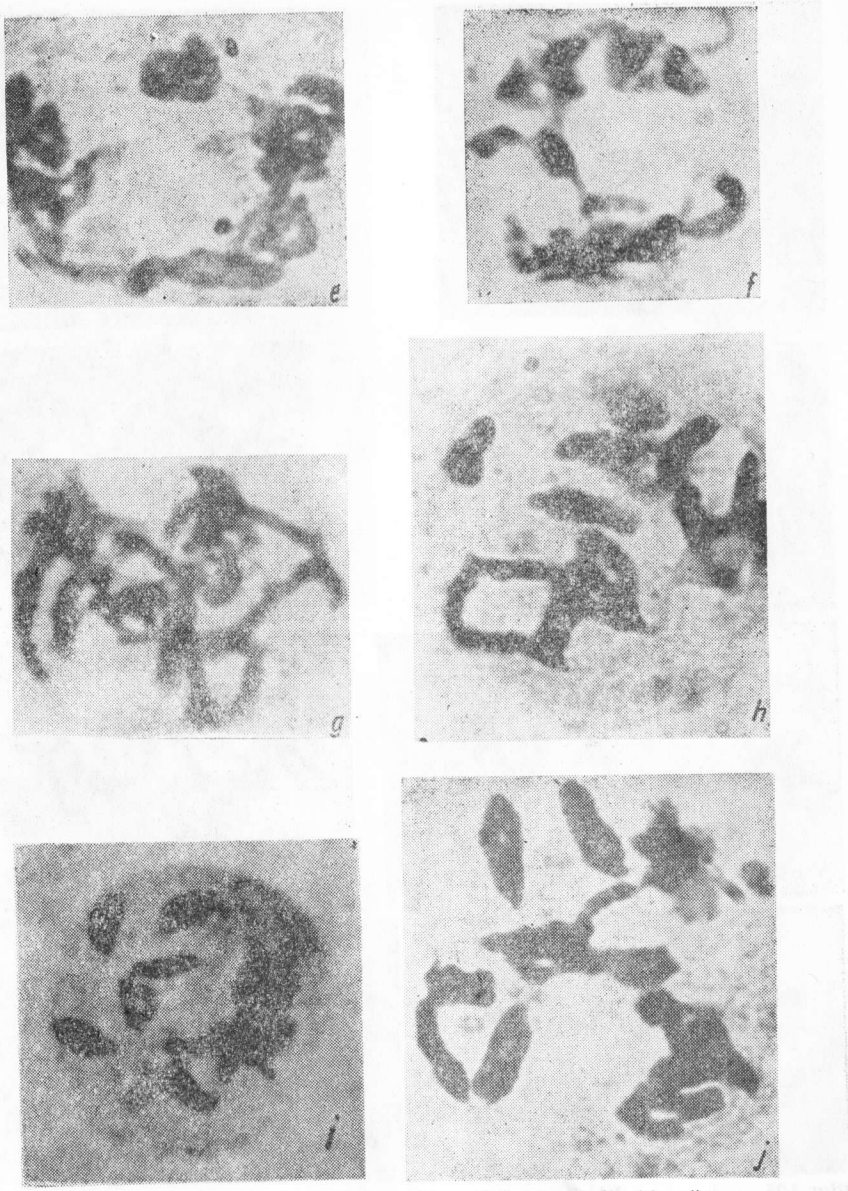


Fig. 105 — *e—g* — diploten; *h* — diploten — diachineză; *i—j* — diachineză;

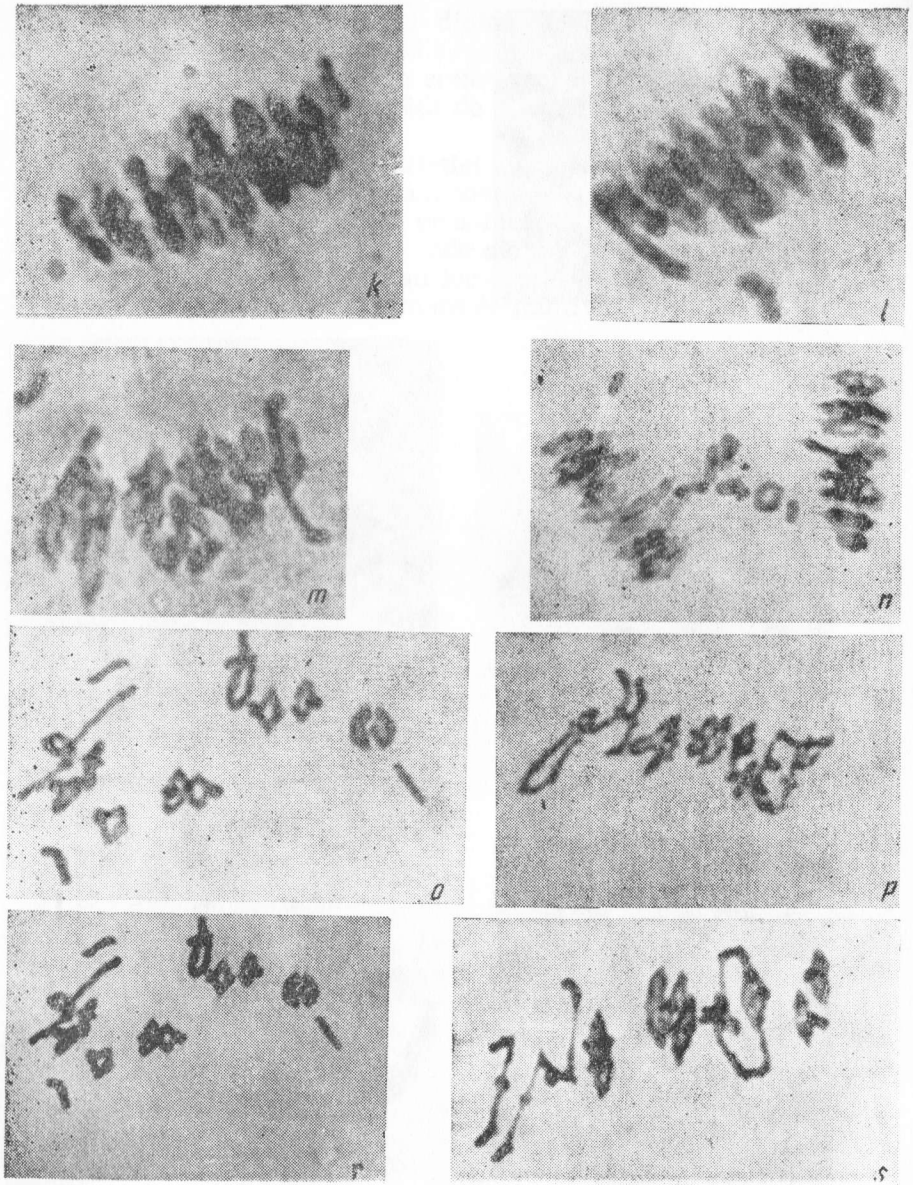


Fig. 105 — *k—n* — diferite aspecte ale metafazei I; *o—s* — metafaza I cu formaţii bivalente şi multivalente precum şi cu univalenţi;

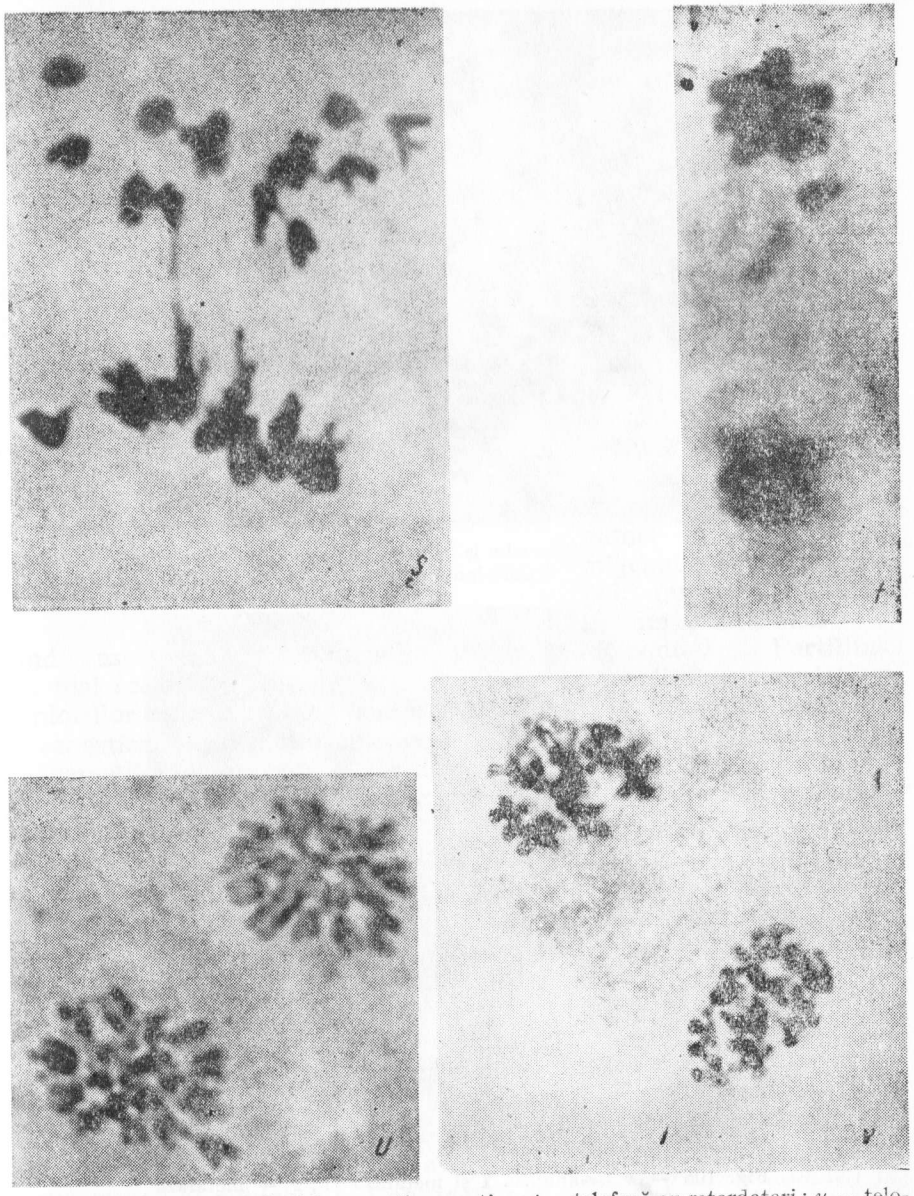


Fig. 105 — *ş* — *ana*-telofază I cu punţi cromatice; *t* — telofază cu retardatari; *u* — telofază uşor squashată cu cîte 14 cromozomi în fiecare nucleu fiu; *v* — telofază squashată;

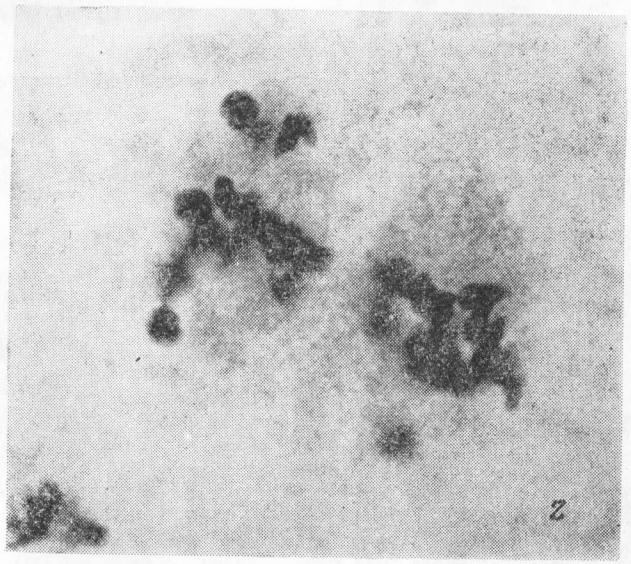


Fig. 105 — *x* — anafaza I şi metafaza II; *z* — metafaza II tîrzie — anafaza II timpurie cu migrarea asincronă a cromozomilor fii spre poli;

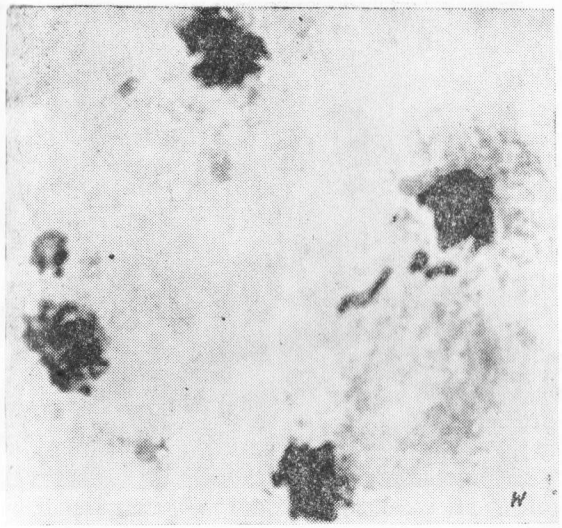


Fig. 105 — *w* — telofaza II cu retardatari şi micronuclei (microfotografiile *o—s* le datorăm amabilităţii dr. Alexandrina Mihăilescu).

În micro şi macrosporogeneză, la plantele tetraploide şi triploide de Citrullus vulgaris s-a evidenţiat apariţia anomaliilor exprimate prin prezenţa univalenţilor, multivalenţilor, retardatarilor în anafază şi telofază, diviziuni asincrone, micronuclei în diade şi tetrade (apariţia micronucleilor în diade şi tetrade este un semn sigur al dereglărilor meiotice; ei iau naştere din univalenţi rămaşi retardatari în A_I şi care, migrînd ulterior spre poli, nu se mai includ în masa nucleilor fii, dînd asemenea micronuclei) triade şi pentade. Fertilitatea mai scăzută a liniilor autotetraploide şi sterilitatea completă a triploizilor sînt expresia unor asemenea anomalii meiotice care duc la repartizarea neechilibrată a cromozomilor spre poli şi la apariţia gameţilor aneuploizi. S-a remarcat faptul că desfăşurarea anormală a macrosporogenezei a determinat avortarea parţială a endospermului şi a embrionului în primele stadii de dezvoltare (I. Anghel, 1969).

Anomalii asemenătoare s-au remarcat şi la formele autotetraploide de orz şi secară. A. Mihăilescu (1972) constată că prezenţa bivalenţilor se corelează cu aceea a tetravalenţilor (univalenţii sînt prezenţi cu frecvenţă mai mare decît trivalenţii) şi că există o corelaţie între frecvenţa micronucleilor din tetrade şi frecvenţa univalenţilor în M_I. Toate aceste anomalii meiotice duc adesea la apariţia gameţilor aneuploizi dintre care unii neviabili sau nefuncţionali (Fig. 106, d).

Fig. 106 — *Sfîrşitul diviziunii meiotice (microsporogenezei) la Secale cereale* (original); *a—f* — tetrade cu microspori.

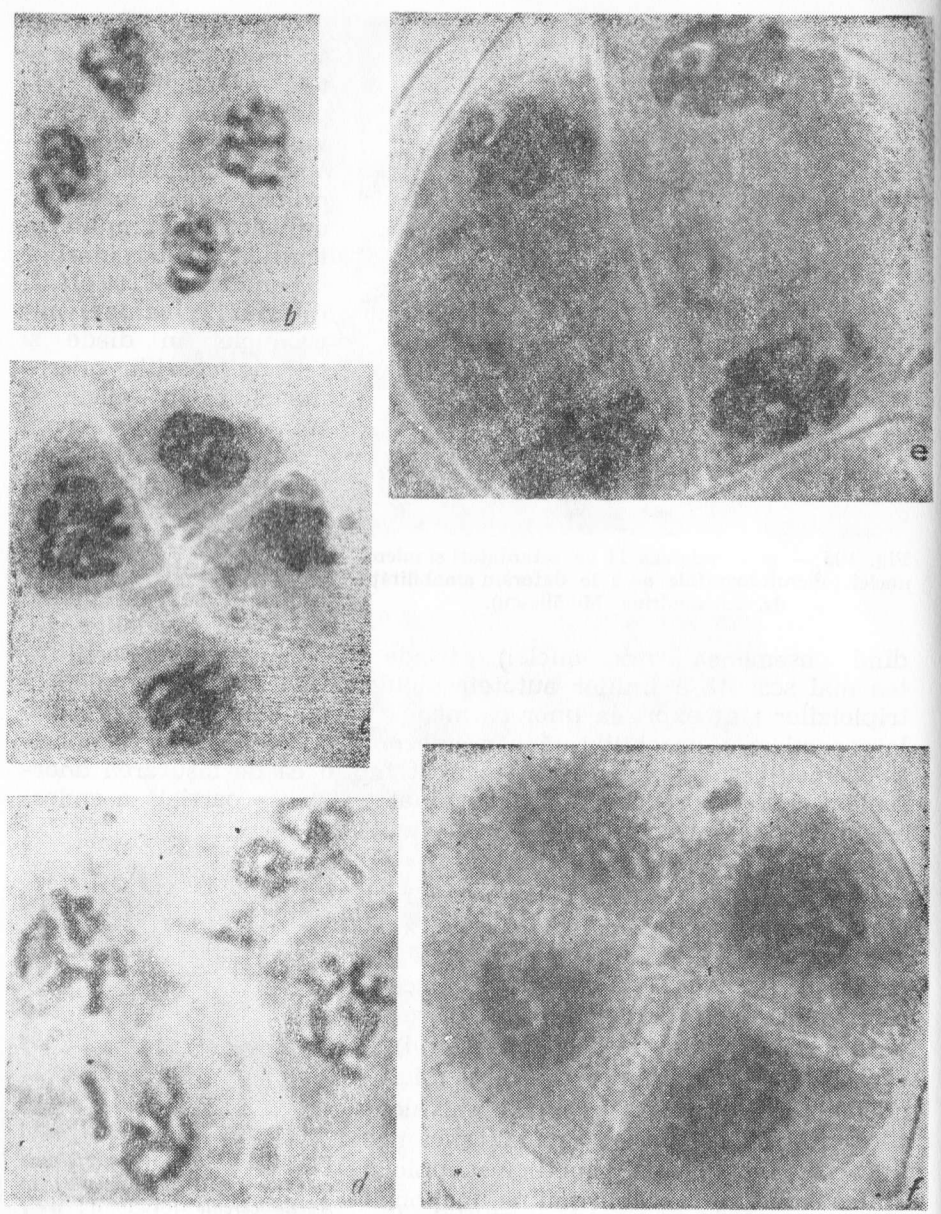


Fig. 106 *b, c, d, e, f.*

Existența unor anomalii meiotice tipice a fost semnalată de asemenea la formele autotetraploide de Antirrhinum majus L. ca dealtfel și apariția gameților aneuploizi (D. Duma, 1972). Numărul de cromozomi ce intră în asociația multivalentă este corespunzător gradului de ploidie. La formele autotriploide (pot lua naștere din unirea unui gamet normal cu un gamet diploid) se pot forma asociații de cîte trei cromozomi, adică trivalenți. Dar se pot forma și asociații bivalente, rămînînd cîte un univalent neasociat sau toți, cromozomii pot să nu se asocieze, rămînînd sub formă de univalenți.

La formele autotetraploide de Cicer arietinum, obținute prin colchicinizare, s-a remarcat că apar formații multivalente la conjugarea cromozomilor și în același timp apar cazuri de asinapsie. Formele cu o fertilitate mai ridicată sînt cele la care, în profaza I, se formează mai puține asocieri multivalente de cromozomi.

S-a stabilit că adevărata conjugare de fapt, la autotriploizi, se realizează numai între doi cromozomi omologi și numai în rare cazuri sînt conjugați toți cromozomii din trivalent, dînd configurații chiasmatice foarte complexe în diploten și diachineză. Asociațiile trivalente sînt mai frecvente la cromozomii lungi și mai puțin frecvente la cromozomii scurți. Se pare că al treilea set haploid de cromozomi la formele autotriploide migrează spre un singur pol, dînd astfel o repartiție neechilibrată a cromozomilor în gameți. Repartiția neechilibrată a cromozomilor duce la nașterea de gameți aneuploizi care sînt de regulă neviabili. Această repartiție neechilibrată a cromozomilor spre poli este amplificată de existența remanierilor cromozomale, în speță a translocațiilor care determină conjugarea între părți diferite ale cromozomilor neomologi. La Ageneotettix deorum deorum, D. D. Shaw (1970) a evidențiat formarea de pseudoasociații multiple de cromozomi. Asocierea cromozomilor neomologi are loc înainte de împerecherea omologilor și formarea chiasmelor, avînd originea în interfază ca urmare a asocierii regiunilor heterocromatice. Majoritatea pseudoasociațiilor multiple se disociază după diakineză, persistînd numai în rare cazuri.

La autotetraploizi asociațiile cromozomale sînt fie bivalente (dar un număr dublu de bivalenți), fie tetravalente. Pot fi de asemenea și alte asocieri (trivalenți cu univalenți), precum și cromozomi neasociați (univalenți). Raportul cantitativ dintre aceste asociații cromozomale este o funcție a structurii și dimensiunii cromozomilor, fiind determinat genetic.

Lungimea mai mare a cromozomilor facilitează realizarea asociațiilor multivalente, pe cînd lungimea medie și mică condiționează realizarea bivalenților respectivi a univalenților. Frecvența chiasmelor este o funcție a lungimii cromozomilor. Numărul și poziția chias-

melor condiţionează la rîndul lor stabilitatea formaţiilor multivalente, între aceşti doi parametri stabilindu-se un raport direct proporţional.

La formele tetraploide de bulboase ornamentale S. N. Raina şi T. N. Khoshoo (1972) au constatat că meioza se desfăşoară în general normal cu formarea de bivalenţi, dar formele mai înalt poliploide, asemănător celor aneuploide, formează în meioză multivalenţi în formă de inele sau lanţuri din 3—8 şi chiar mai mulţi cromozomi. Uneori, la nivel tetraploid, în cazul acestor forme bulboase, diferenţierea cromozomilor este relativ înaltă. La Zephyranthes, microsporogeneza decurge cu formarea a doisprezece bivalenţi. Uneori la formele autotetraploide apar tetravalenţi inelari sau sub formă de lanţ, prezentînd configuraţii cu triple chiasme. În acelaşi timp au fost remarcate şi fusuri multiple.

Prezenţa trivalenţilor şi a univalenţilor condiţionează o repartizare neechilibrată a cromozomilor spre poli, din care cauză iau naştere gameţi aneuploizi, de regulă sterili.

La tetraploizii de Oenothera, H. M. Lawes (1967) a observat apariţia diferitelor asociaţii de cromozomi de la tetravalenţi pînă la univalenţi (Fig. 107). Uneori apar inele sau lanţuri formate din 20 de cromozomi. Autorul apreciază că la formele tetraploide fertilitatea este mai scăzută atunci cînd acestea provin din diploizi structural heterozigoţi şi mai ridicată cînd provin din diploizi homozigoţi.

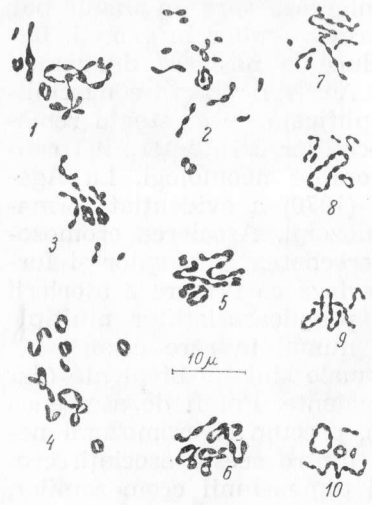


Fig. 107 — *Configuraţii meiotice la tetraploizii de Oenothera 1, 2* — O. parodiana Villa Nougues; *3—4* — O. affinis FeI *5, 6* — O. mollisima Carrasco; *7, 8* — O. affinis Florida; *9, 10* — O. affinis Toledo (după H. N. Laws, 1967).

Repartizarea cromozomilor spre poli este în funcţie nu numai de tipul de asociaţie a cromozomilor omologi (Fig. 108) ci şi de coorientările centromerilor cromozomilor omologi (Fig. 109). Coorintarea liniară precum şi cea paralelă asigură de regulă o repartizare echilibrată a cromozomilor spre poli. Coorientarea convergentă, dar mai ales cea indiferentă, determină o repartizare neechilibrată a cromozomilor spre poli.

Concepţia clasică asupra cauzei fertilităţii reduse la autopoliploizi se bazează pe datele citologiei meiozei punînd acest fenomen pe seama for-

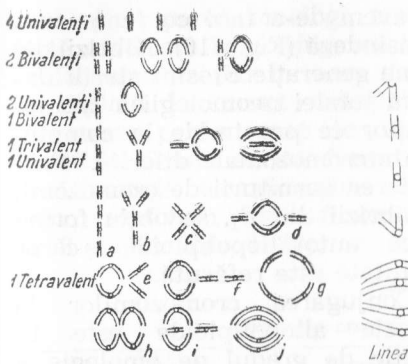


Fig. 108 — *Tipuri de asocieri ale celor patru cromozomi omologi la autotetraploizi* (după Dawson, 1962, din P. Raicu, 1967).

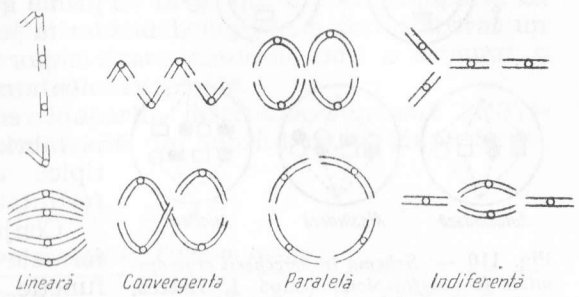


Fig. 109 — *Coorientările posibile ale tetravalenţilor* (axa fusului de diviziune este verticală) (după G. W. P. Dawson, 1962).

mării de asociaţii multivalente, alături de care rămîn şi cromozomi neasociaţi, adică univalenţi. În anafază apar anumite anomalii meiotice cum ar fi retardatarii, punţi, fragmente de cromozomi etc. Formele autopoliploide apărute pe cale naturală în decursul evoluţiei lor şi-au regularizat meioza fiind deplin fertile, formînd în meioză doar asociaţii bivalente de cromozomi. Formele induse experimental, au însă o meioză ce se desfăşoară cu dereglări printre care asocieri multivalente, alături de cele bivalente, iar uneori cu cromozomi distribuiţi în afara limitelor fusului de diviziune. Astfel, repartizarea cromozomilor în A_I, la Fragaria ananassa, poliploid obţinut experimental, este neechilibrată.

Meioza la allopoliploizi prezintă unele particularităţi legate de natura genetică a acestor forme. Allopoliploizii provin în urma hibridărilor interspecifice, sau intergenerice, numindu-se hibrizi îndepărtaţi sau genomohibrizi, care reunesc într-un singur individ genomuri neomoloage. Din această cauză în meioză, repartizarea cromozomilor la cei doi poli ai fusului nuclear se face neregulat, rezultînd gameţi sterili. În urma poliploidizării genomohibrizii din F_1 devin fertili.

Împerecherea în meioza allopoliploizilor a cromozomilor perfect omologi, ce provin de la aceeaşi formă paternă sau maternă, se numeşte autosindeză. Fenomenul de împerechere a cromozomilor ce provin de la ambii părinţi, pe baza unei omologii parţiale a acestora, se numeşte alosindeză. Cînd nu are loc neîmperecherea cromozomi-

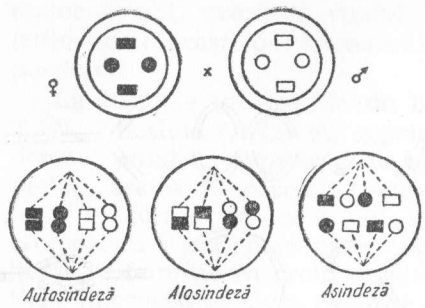


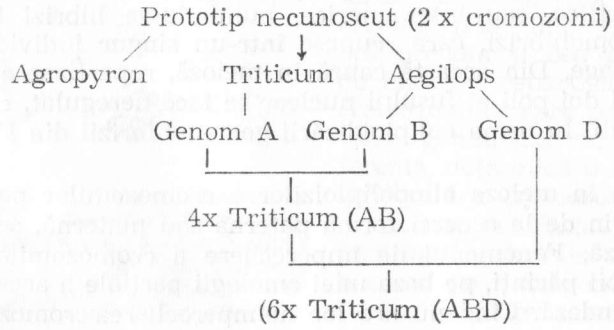
Fig. 110 — *Schema împerecherii cromozomilor la amfidiploizi* (după I. Drăcea, 1972).

lor avem de-a face cu fenomenul de asindeză (Fig. 110). Hibrizii din prima generaţie F_1 sînt sterili datorită totalei neomologii a cromozomilor ce provin de la complemente cromozomale diferite. Prin dublarea garniturii de cromozomi, la hibrizii din F_1, se obţin forme tipice auto-allopoliploide a căror fertilitate este refăcută.

Conjugarea cromozomilor la formele allopoliploide este în funcţie de gradul de omologie a genoamelor ce intră în garnitura de cromozomi a acestor forme. La formele izosindezice, la care nu există omologie între genoamele formelor ce au participat la încrucişare, conjugarea cromozomilor se realizează cu formarea de bivalenţi. La formele izoanizosindezice sau segmentale există o omologie parţială sau remarcabilă între cromozomii genoamelor participante la formarea complementului cromozomal al allopoliploizilor, din care cauză conjugarea cromozomilor se realizează cu formarea de multivalenţi, comparabil cu situaţia conjugării la autopoliploizi.

La Triticum aestivum, care este un allohexaploid segmental natural ($2n = 6x = 42$, $x = 7$, la genul Triticum), în garnitura de cromozomi se află cromozomi ce aparţin la trei genoame (AA BB DD); genomul A aparţine lui Triticum monococcum, genomul B, lui Aegilops speltoides, iar genomul D, lui Aegilops squarrosa.

Originea speciilor poliploide de grîu poate fi evidenţiată în această schemă a lui G. D. H. Bell (1965).



Deşi în parte, omologi, cromozomii acestor trei specii nu manifestă omologie în conjugarea la Triticum aestivum, meioza acestuia desfăşurîndu-se cu formare de 21 de bivalenţi, deci se comportă ca un diploid. În cursul evoluţiei acestui hexaploid a fost elaborat un mecanism perfecţionat de diploidizare naturală care a asigurat o înaltă fertilitate acestei forme allohexaploide.

Omologia cromozomilor ce aparţin diferitelor genoame la Triticum aestivum poate fi constatată din tabelul nr. 3 (după Sears, 1958 şi Okamoto, 1962).

TABELUL Nr. 3

Omologia cromozomilor la Triticum aestivum

Grupa homeoloagă	Genom A		Genom B		Genom D	
0	1		2		3	
1	XIV	(1A)	I	(1B)	XVII	(1D)
2	XIII	(2A)	II	(2B)	XX	(2D)
3	XII	(3A)	III	(3B)	XVI	(3D)
4	IV	(4A)	VIII	(4B)	XV	(4D)
5	IX	(5A)	V	(5B)	XVIII	(5D)
6	VI	(6A)	X	(6B)	XIX	(6D)
7	XI	(7A)	VII	(7B)	XXI	(7D)

Riley şi Chapman au stabilit că pe cromozomul V, ce aparţine genomului B, se află o genă ce împiedică conjugarea cromozomilor din genoamele omoloage. Formele de grîu, la care lipseşte perechea a V-a, prezintă o meioză anormală, în care are loc conjugarea cromozomilor omologi ce aparţin la cele trei genoame. Nu acelaşi lucru se întîmplă însă în cazul cînd se încrucişează T. aestivum x Ae. speltoides. La acest hibrid, absenţa cromozomului nu influenţează mersul conjugării. Deşi cromozomii V, IX şi XVIII sînt omologi, cromozomii suplimentari IX şi XVIII nu pot compensa absenţa cromozomului V, fapt dovedit de studiul meiozei la nulisomici, pentru perechea V, şi tetrasomici, pentru perechea IX şi XVIII, la care se remarcă conjugarea între cromozomii omologi ce aparţin diferitelor genoame.

B. C. Yoshi, R. N. Sawhney, W. Singh şi S. Kumar (1970) au constatat că la monosomicii de Triticum, soiurile Chinese Spring şi Pb.C_{591}, cromozomii 1B, 4B şi 6B controlează segregarea bipolară regulată a cromozomilor omologi ai fiecărui bivalent, iar cromozomii 1B, 4B, 2D şi4D menţin integritatea cromozomului la centromer, prezenţa lor într-o singură doză determinînd diviziunea anormală a centromerului, ducînd la formarea de izocromozomi sau de telocentrici.

G. A. Dover și R. Riley (1972) au stabilit că limitarea împerecherii meiotice în cazul cromozomilor homeologi (cromozomi parțial omologi, aparținînd diferitelor genoame A, B, D) la Triticum aestivum se află sub controlul unui locus „Ph" plasat pe brațul lung al cromozomului V B (Ph = gena ce previne împerecherea homeologilor). Plasarea genei „Ph" pe brațul lung al cromozomului V B și nu pe brațul scurt al său, s-a admis pe baza constatării că împiedicarea conjugării homeologilor se realizează chiar în condițiile în care lipsește (prin deleție) brațul scurt al acestui cromozom. Cînd însă lipsește brațul lung nu mai este împiedicată împerecherea homeologilor, căci nu mai e prezentă gena „Ph" (R. Riley, 1965). Riley și Chapman au arătat că plantele cu 42 de cromozomi ditelocentrice pentru brațul lung au format bivalenți în meioză, pe cînd cele ditelocentrice pentru brațul scurt au format multivalenți.

Genotipurile a două forme înrudite cu grîul, avînd 14 cromozomi, Aegilops speltoides și Aegilops mutica pot supresa activitatea genei „Ph". La hibrizii dintre grîu și aceste specii diploide de Aegilops, meioza se desfășoară cu împerecherea cromozomilor homeologi și neomologi ai genoamelor A, B și D, favorizînd recombinarea genelor la cromozomii respectivi.

Interesant este faptul că la hibrizii dintre grîu și alte specii ale genului Aegilops, nu se manifestă supresia activității genei „Ph".

Se apreciază, din această cauză, că alela „Ph" este recesivă față de gena dominantă ce se află la Ae. speltoides și Ae. mutica și că ar fi fost posibil ca alela de la grîu să se fi născut prin mutație în timpul, sau imediat după combinarea genoamelor A și B, care a dus la nașterea grîului tetraploid. Studiindu-se hibrizii grîu — Ae. mutica, care segregă în patru clase cu diferite nivele ale împerecherii meiotice a cromozomilor, s-a stabilit că segregarea se face după un model ce concordă cu prezența a doi loci, fiecare cu cîte două alele la Ae. mutica, care determină lărgirea împerecherii homeoloage. Există clasa de hibrizi grîu/Ae. mutica cu o medie de 1,51; 4,13; 7,06 și 12,91 chiasme per celulă. Clasele cu valori mai scăzute indică prezența de alele la Ae. mutica care nu supresează efectul alelei Ph, de la grîu, sau care inhibă activ împerecherea homeoloagă.

Unii indivizi de Ae. mutica poartă cromozomi suplimentari (supranumerari, cromozomi B). În prezența cromozomului V B, cromozomii supranumerari de Aegilops mutica, aparent, nu au efect asupra modelului de împerechere meiotică a cromozomilor. La fel se întîmplă și la hibrizii T. aestivum X Ae. speltoides, la care cromozomii supranumerari sînt transmiși de către Aegilops.

Prezența cromozomilor supranumerari la hibrizii deficienți pentru cromozomul 5B determină o reducere marcantă a împerecherii homeologilor în contrast cu împerecherea extinsă a homeologilor care apare întotdeauna în absența cromozomului V B (tabelul nr. 4).

TABELUL Nr. 4

Clasa de împerechere	Cromozomul 5B			
	Prezent		Absent	
Joasă	0,93	(2)	0,98	(2)
Intermediară (joasă)	3,27	(1—4)	2,65	(2)
Intermediară (înaltă)	9,32	(1—6)	—	
Înaltă	16,30	(1—5)	19,93	(0)

Într-adevăr, prezența cromozomilor supranumerari creează o situație în care apare o compensație pentru absența cromozomului V B de grîu. Efecte similare ale cromozomilor supranumerari asupra împerecherii meiotice a homeologilor au fost descrise la Lollium.

Dover și Riley (1972) admit trei posibilități pentru apariția efectului genei „Ph" plasată pe cromozomul V B, la grîu:

— includerea, atunci cînd a luat naștere forma allotetraploidă de grîu, a unui cromozom standard ce nu poate fi detectat printre diploizii actuali de grîu și a cărui activitate împiedică sinapsisul homeologilor;

— apariția, prin mutație, la poliploid, a unei alele ce împiedică sinapsisul homeologilor;

— încorporarea în cromozomul V B de material genetic ce aparține cromozomului suplimentar și care i-a conferit proprietatea de a limita împerecherea homeologilor.

Gena „Ph" plasată pe cromozomul V B face ca fenomenul de conjugare a cromozomilor la grîu să fie de tip diploid, cu toate că această specie este alohexaploidă. Conjugarea se realizează între doi cîte doi cromozomi omologi ce aparțin fie genomului A, fie genomului B, fie genomului D. În absența cromozomului V B se înregistrează o favorizare a împerecherii cromozomilor grîului cu cei ai altor specii (de ex. Secale cereale, Aegilops columnaris), realizîndu-se astfel recombinarea genelor de la genuri diferite, fapt important pentru practica ameliorării în care se urmărește transferul de gene valoroase de la alte specii, la Tr. aestivum.

Riley și Chapman au descoperit că la T. aestivum, lipsit de cromozomul V B, are loc împerecherea homeologilor, adică a cromozomilor ce aparțin genoamelor diferite (A, B, D). Adică pot să apară

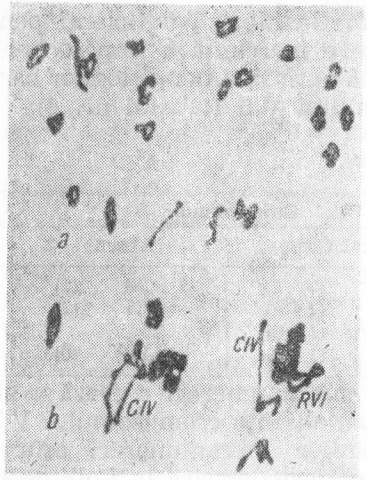


Fig. 111 — *Influența cromozomului V. B. asupra conjugării homeologilor la T. aestivum* (după R. Riley, 1965). *a* — formarea bivalenților la alohexaploidul normal (2n = 6x = 42); *b* — formarea polivalenților de diferite tipuri și a bivalenților (1R VI + 2CIV + 2CIV + 13II) la un nulisomic pentru cromozomul V B.

conjugări între cromozomii XIV din genomul A, I din genomul B și XVII din genomul D etc. (Fig. 111).

În 1971, Wall, Riley, și Gale au denumit cu simbolul „Ph" o genă plasată pe brațul mai lung al cromozomului V B și care împiedică împerecherea între cromozomi homeologi. În același an, Evans și Macefield constată că prezența cromozomilor supranumerari (cromozomii notați cu B spre a-i deosebi de cromozomii obișnuiți ai garniturii normale diploide notați cu A) pot supresa împerecherea homeologilor la hibrizii dintre forma diploidă și tetraploidă de Lollium (Lollium temulentum x. L. perenne).

În 1972, Dover și Riley arată că efectul cromozomilor supranumerari la Triticum este același ca la hibrizii de Lollium, putînd compensa absența genei „Ph" de pe cromozomul V B, împiedicînd conjugarea homeologilor. Evans Macefield și Dover și Riley sugerează că gena „Ph" poate fi adusă, în evoluția formei allohexaploide de Tr. aestivum, de cromozomi supranumerari, printr-un proces de transslocație. Descoperirea aceasta are și implicații practice, sugerînd folosirea cromozomilor supranumerari pentru a determina regularizarea comportamentului cromozomal în meioză și creșterea fertilității la allopoliploizii sintetici.

Riley a emis în 1966 ideea că mecanismul reglării împerecherii cromozomilor la grîu, în meioză, nu se bazează numai pe gena sau genele pentru asinapsie, plasată pe cromozomul V B, ci el poate fi condiționat de gene majore plasate pe cromozomii 3B și 5B și de gene minore plasate pe cromozomii 3A și 3D. Unele gene controlează conjugarea cromozomilor omologi pe cînd altele controlează formarea sinapselor (N. Ceapoiu, 1972).

Și la alte plante se evidențiază în mod obișnuit un număr variat de cromozomi B, la porumb, această variație fiind în limitele 1-34. Cromozomii B de la Digitaria sp. pot prezenta constricție primară de tip median sau submedian (K. G. Shambalingappa, 1968). Ei pot

rămîne ca univalenți în profraza I. Poate avea loc o disjuncție normală în A_I a cromozomilor B.

Cromozomii B pot fi heterocromatici sau eucromatici. Darlington apreciază că la Gramineae ei sînt în mod obișnuit heterocromatici. Prezența unui număr mare de cromozomi B scade vitalitatea și fertilitatea plantelor. Ei apar în urma dereglării meiozei, fragmentării cromozomilor A sau diviziunii inegale a centromerului. Cromozomii suplimentari sînt inerți sau subinerți, din punct de vedere genetic, nu totdeauna fiind evidente efectele fenotipice determinate de prezența lor. Ei sînt de obicei mici și heterocromatici. În urma fragmentării pot să apară cromozomi și mai mici care au fost notați pe diferite categorii: C, D, E, F. Ei au fost evidențiați la multe graminee (Zea, Festuca, Lollium, Secale, Aegilops) precum și la alte plante superioare Trillium, Caltha etc. Cromozomii B apar mai bine evidențiați în pachitenul meiozei. Ei nu se conjugă cu cromozomii A și nici între ei, rareori asociindu-se ca bi și multivalenți (J.J.B. Gill, 1971). De obicei ei merg spre un singur pol incluzîndu-se în nucleul acelor celule care dau ovule în megasporogeneză. Microcromozomii de la păsări, comparabili din punct de vedere al comportamentului meiotic cu cromozomii B sînt considerați a fi jucat un rol deosebit în evoluția acestui grup de vertebrate. Prin faptul că nu se asociază în meioză spre a forma bivalenți între care să aibe loc schimbul de material genetic (recombinarea prin crossing-over) ei sînt considerați a fi păstrătorii și purtătorii unor grupe ancestrale de linkaj, fapt ce ar fi conferit păsărilor majore avantaje selective.

La Puschkinia libanotica (Liliaceae) P. W. Barlow și C. G. Vosa (1970) au constatat că prezența cromozomilor supranumerari, parțiali heterocromatici, în celulele mamă polinice, ridică frecvența chiasmei la nivelul bivalenților cromozomilor A. Același lucru îl constată L. Zecević și D. Paunović (1968), studiind meioza în populațile de secară. În a doua diviziune mitotică a grăuncioarelor de polen, cromozomii B nu se disjung, avînd loc formarea izocromozomilor în dezvoltarea sporofitului, fapt remarcat și de W. R. Carlson (1970) la porumb.

Efectul cromozomilor suplimentari devine evident atunci cînd sînt în număr mare, de exemplu, la Centaurea scabiosa, cînd depășesc numărul de 30.

Nici în microsporogeneza de la ovăz și secară nu are loc disjuncția cromozomilor B în prima diviziune a nucleului microsporilor (Fig. 112).

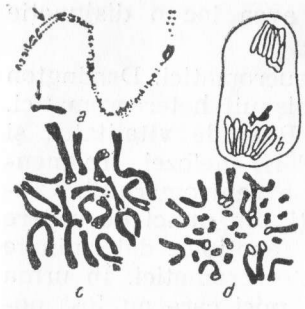


Fig. 112 — *Cromozomii suplimentari* (după Müntzing, 1967). *a* — cromozom B standard la secară; *b* — prima diviziune mitotică la grăunciorul de polen de secară cu un cromozom B care nu segregă; *c* — complementul cromozomal de secară cu 14 cromozomi obișnuiți și 4 cromozomi B mici, acrocentrici; *d* — complementul cromozomal cu 14 cromozomi obișnuiți și 15 cromozomi supranumerari (B).

La speciile genului Sorghum se înregistrează un interesant aspect de eliminare a cromozomilor suplimentari din celulele vegetative, fiind păstrați doar în celulele liniei germinale.

La Festuca pratensis, Centaurea scabiosa, un anumit număr de cromozomi B are efect favorabil asupra dezvoltării plantei. La Dactylis glomerata, se remarcă nondisjuncția și migrarea preferențială a cromozomilor B în nucleul generativ.

După cum am văzut, cercetări recente implică cromozomii B în conjugarea cromozomilor, în meioza formelor allopoliploide, fapt demonstrat în special la grîu.

Rosa canina este un allopentaploid, care prezintă patru genoame AA B C D ($2n = 5x = 35$). În microsporogeneză are loc conjugarea cromozomilor genomului AA, pe cînd cromozomii genoamelor B, C, D, fiind reprezentați printr-un singur set haploid, rămîn neconjugați. Dar viabile sînt doar grăuncioarele de polen în al căror nucleu haploid se află 7 cromozomi de la genomul A. Pe de altă parte viabili sînt doar megasporii ce au 28 de cromozomi, cîte 7 de la fiecare genom. Prin această funcționare selectivă a gameților se poate păstra, prin fecundare, nivelul pentaploid (AA B C D).

S-a constatat că genomul de Rosa rugosa ($2n = 2x = 14$) manifestă acțiune dominantă sau epistatică asupra genelor care controlează conjugarea la R. canina, căci în meioza hibridului R. canina x R. rugosa o parte din cromozomii de R. rugosa se conjugă cu cromozomii de R. canina, apărînd 11-14 bivalenți.

Controlul genetic al meiozei la formele allopoliploide a fost elaborat în cursul evoluției. Selecția a păstrat doar allopoliploizii care și-au diploidizat meioza, devenind stabili, evitîndu-se formarea multivalenților în conjugarea meiotică care se desfășoară cu formarea bivalenților, ca la formele diploide tipice. Prin mutații genice și remanieri cromozomale, în speță de tipul translocațiilor, s-a conturat un mers normal al meiozei, în care a fost eliminată conjugarea cromozomilor homeologi ce aparțin diferitelor genoame.

La amfiploizi, ce reprezintă allotetraploizi în a căror garnituri de cromozomi se află garniturile diploide ale formelor care au participat la hibridarea interspecifică, sterilitatea hibrizilor din prima generație (la care nu are loc conjugarea cromozomilor, aceștia fiind neomologi) este înlăturată prin dublarea numărului de cromozomi, ceea ce crează posibilitatea împerecherii cromozomilor. Dar este foarte dificilă restabilirea completă a fertilității amfidiploizilor. Constanța Popescu (1975) a efectuat cercetări complexe la amfiploidul de tip Triticale, constatînd dereglări notabile ale meiozei și sterilitatea polenului. Asemenea cercetări a efectuat și Iordachie Tudose, de la Universitatea din Iași.

La amfidiploidul Triticale, un hibrid grîu × secară, dereglarea meiozei este cauzată de incompatibilitatea nucleului și citoplasmei. Prin allosindeză, în urma căreia conjugă, baza omologiei parțiale, cromozomi de grîu și secară, între care se realizează un schimb de segmente, se formează cromozomi ce reprezintă combinații noi de gene de tip grîu-secară. Adesea în A_I cromozomii de secară rămîn ca retardatari în placă și prin aceasta se ajunge la formarea gameților aneuploizi care sînt sterili. Sînt consemnate și cazurile în care în microsporocite, genomul de secară formează un nucleu de-sinestătător care va suferi diviziunea meiotică, ca și cazuri de dereglare în funcționarea fusului de diviziune, ceea ce explică dificultatea regularizării meiozei la formele de Triticale. După Müntzing, apariția univalenților în meioza de la Triticale este rezultatul funcționării genelor recesive, dăunătoare, ce controlează meioza. Mai mult, s-a constatat că apar modificări funcționale ale genelor implicate în sinteza macromoleculelor de bază indispensabile desfășurării meiozei. Astfel a putut să fie evidențiată o sinteză mai intensă de ADN în interfaza microsporocitelor de Triticale în comparație cu nivelul sintezei la formele genitoare, grîu și secară.

La formele hibride interspecifice, meioza se poate desfășura în condiții de completă asinapsie, ceea ce înseamnă că cromozomii rămîn sub formă de univalenți. Gradul de dereglare a meiozei este o funcție a gradului de înrudire a cromozomilor parentali, a numărului, morfologiei și structurii cromozomilor formelor genitoare.

Meioza la formele hibride interspecifice, în funcție de aceste caracteristici, poate decurge normal (cînd în ciuda unei desfășurări normale a meiozei, hibridul F_I este complet steril, acest fapt este datorat anomaliilor criptice ale hibridării — S. Kajasekaran, 1971 — sau prezenței diferențelor mai ales la nivel genic — H. P. Riley, 1967 — deși are loc conjugarea deplină a cromozomilor și distribuție echilibrată a lor în gameți) sau poate decurge cu conjugarea parțială și cu prezența univalenților (Fig. 113). Cînd au loc remanieri cromozomale, la acești hibrizi interspecifici, poate avea loc chiar conjugarea deplină a cromozomilor. Uneori chiar în condiți-

Fig. 113 — *Metafaza I la hibridul F_1, Eyprecnemis plorans ornatipes X E. p. meridionalis* (după John și Lewis, 1965). *a* — 11 bivalenți + X (6 bivalenți sînt heteromorfi/săgețile/) ; *b* — 10 bivalenți + 2 univalenți + X (doi univalenți autosomali sînt inegali în dimensiune și 5 /săgețile/sînt heteromorfici).

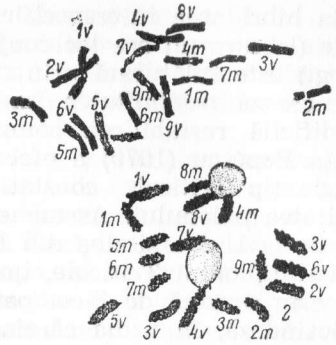


Fig. 114 — *Cromozomi somatici și meiotici la hibrizii F_1 de Chrysanthemum makinoi, Ch. vulgare.* Cromozomii parentali se disting prin diferențe în lungime și lățime și poziția centromerilor. Cromozomii de Ch. makinoi sînt notați cu „m" iar cei de Ch. vulgare cu „v". sus — cromozomi somatici la hibridul F_1. jos — cromozomi meiotici în celule mamă polinice (P. M. C.), în diachineza hibridului F_1, 1 II + 16 I. Bivalentul este 1m — 1v. cinci univalenți 4 m, 8 m, 4 v, 7 v, 7 v, și 8 v au sateliți și sînt atașați de nucleoli (X1200., după R. Tanaka și N. Shimotomai, 1968).

ile unei conjugări depline a cromozomilor, datorită anomaliilor fuzoriale și dereglărilor ulterioare, legate mai ales de separarea anafazică, meioza poate decurge anormal sau poate fi stopată în profaza I. Dereglările meiozei la hibrizii interspecifici nu sînt condiționate numai de gradul de omologie a cromozomilor, ci și de dereglările în funcțiunea cromozomilor (cum ar fi nefuncționarea regiunilor organizator nucleolar și apariția de meiocite fără nucleol, fapt care blochează meioza la începutul său — așa cum au constatat Holden și Mata la hibrizii interspecifici de ovăz sau dereglări în funcțiile tapetumului, cu implicații în diferențierea meiocitelor la hibridul dintre măr și păr.

Și condițiile de temperatură pot influența desfășurarea meiozei la hibrizi,creșterea temperaturii mărind gradul de dereglare. La hibridului Chrysanthenum vulgare x Ch. makinoi s-a constatat desfășurarea neregulată a meiozei (Fig. 114) cu foarte săracă împere-

chere a cromozomilor. La hibrizii interspecifici de Collinsia, se apreciază că frecvența chiasmelor are semnificație citotaxonomică.

Datorită remanierilor cromozomale apar fragmentări de cromozomi și punți cromatice anafazice.

Uneori poate avea loc conjugarea cromozomilor diferențiați morfologic, formîndu-se bivalenți heteromorfi, așa cum au observat Naylor și Ress la hibridul Lollium temulentum × L. perenne și John și Lewis, la hibridul Narcissus poeticus (2n = 14) × N. tazetta (2n = 20) la care s-au format șapte bivalenți heteromorfi.

Studiul meiozei la hibrizii interspecifici este de mare însemnătate căci ne permite să stabilim afinitățile filogenetice dintre formele genitoare.

Este interesant de remarcat că dereglările meiozei la formele hibride interspecifice se exprimă pregnant în prima generație hibridă. În generațiile următoare ele sînt diminuate, avînd loc fenomenul de regularizare a meiozei, cunoscut sub numele de diploidizare. În practică acest proces de diploidizare se încearcă să fie stimulat prin supunerea formelor hibride la iradiere cu scopul apariției remanierilor cromozomale, care limitează gradul înalt de omologie la formele autoallopoliploide.

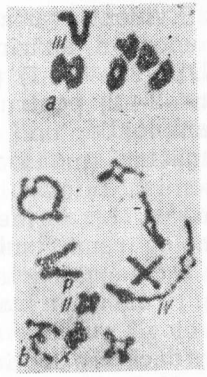


Fig. 115 — *Conjugarea cromozomilor* (după John și Lewis, 1965) la trisomicul de secară (2n = 2n + 1 = 15) : *a.* cu formarea a 6 bivalenți și a unui trivalent (III) și la tetrasomicul de Pyrgomorpha kraussi (b) cu formarea unui tetravalent (IV) și 8 bivalenți (cromozomul X este univalent).

La formele aneuploide (Fig. 115), la care variația numărului de cromozomi nu afectează întregul complement cromozomal, ci una sau cîteva perechi de cromozomi, meioza se desfășoară cu anumite dereglări cum ar fi prezența univalenților (pentru formele monosomice) sau multivalenților pentru formele tetrasomice sau trisomice. Variația numărului de cromozomi în cazul formelor aneuploide este următoarea, dacă vom considera că forma normală diploidă = disomică (2n) are formula genomică AA BB CC DD:

AA BB CC D	— pentru monosomici (2n—1)
AA BB CC — —	— pentru nulisomici (2n—2)
AA BB C-D —	— pentru dublu monosomici (2n—1—1)
AA BB CC DDD	— pentru trisomici (2n+1)
AA BB CC DDDD	— pentru tetrasomici (2n+2)
AA BB CCC DDD	— pentru dublu trisomici (2n+1+1)
AA BB CCCC DDDD	— pentru dublu tetrasomici (2n+2+2)

Evident, variația poate afecta în felurite chipuri perechile de cromozomi, apărînd aspecte combinate ale acestor cazuri: AA B CC DDD (2n—1+1) pentru monosomie + trisomie sau AA CC DDDD (2n—2+2) pentru nulisomie + tetrasomie etc. În aceste cazuri de aneuploidie, unii cromozomi pot rămîne fără omologii lor corespunzători (monosomie), iar în cazurile de trisomie, tetrasomie (polisomie), numărul de omologi ai unei grupe de cromozomi este crescut. La formele monosomice, cromozomii lipsiți de partenerul omolog rămîn sub formă de univalenți în profaza meiotică, cînd au loc fenomenele sinaptice, pe cînd în cazurile de polisomie apar multivalenți, trivalenți, respectiv tetravalenți. Se întîmplă însă ca, omologii suplimentari să nu conjuge cu perechea corespunzătoare sau dacă are loc inițial o conjugare, ea să fie anulată prin desinapsie. Univalenții și cromozomii suplimentari segregă anarhic în A sau se pierd în cursul diviziunii, din care cauză se ajunge la formarea gameților aneuploizi, explicîndu-se astfel gradul redus de fertilitate al acestor forme aneuploide. Cu toate acestea, formele aneuploide sînt foarte importante genetic, atît teoretic cît și practic, permițînd o analiză mai precisă, uneori indirectă, alteori directă, asupra caracteristicilor genotipice ale diferitelor organisme. Teza plasării liniare a genelor în anumiți loci pe cromozomi, a fost elaborată pe baza studiului mutantei „eyeless", de Drosophila melanogaster care, în loc de $2n = 8$ cromozomi, prezenta $2n—1 = 7$ cromozomi. Trisomia primară este urmarea nondisjuncției cromozomilor omologi în meioză. Dacă considerăm doi cromozomi care formează chiasme, la o specie normal chiasmatică, probabilitatea ca ambii cromozomi să meargă spre același pol este de $2\left(\frac{1}{2}\right)^n$ în care „n" reprezintă numărul cromozomilor neîmperecheați. Se vor produce cca. 25% gameți trisomici (n+1). Există o trisomie diferențiată a gameților (n+1) pe linie maternă și paternă. La plante, trisomia se moștenește mai ușor pe linia maternă. De obicei diploizii tipici nu pot să suporte pierderea a doi omologi din set, așa încît nulisomicii apar mai ales la formele poliploide. Prin meroaneuploide are loc creșterea sau descreșterea unor părți ale cromozomilor normali parentali, spre deosebire de haloaneuploidie care implică variația numerică ce afectează cromozomii întregi.

Agmatoploidia duce la creșterea numărului de cromozomi fără modificarea conținutului de gene funcționale. Fragmentările cromozomiale apar în regiuni cu ADN repetitiv — nefuncționale. Trisomicii terțiari sînt produși prin interschimburi.

În patologia umană, trisomia cromozomilor de sex sau a perechii 21 de autozomi, datorată nondisjuncției cromozomilor în ovogeneză prezintă un tablou clinic extrem de grav.

Toate cazurile de variație a numărului de cromozomi care afectează anumite perechi de cromozomi sau întregul complement cromozomal intră în sfera pseudoaneuploidiei și a pseudopoliploidiei dacă o asemenea variație numerică nu este însoțită de o variație corespunzătoare în cantitatea de ADN.

După Battaglia, pseudopoliploidia poate să fie fragmentațională (apărută prin fragmentarea cromozomilor normali mai mult sau mai puțin mari în cromozomi mici), agmatoploidă sau agmatopseudoploidă (întîlnită la formele cu centromeri nelocalizați, difuzi și realizată tot prin fragmentare) și pseudopoliploidia formelor cu cromozomi policentrici mari, așa cum sînt cei de la Spirogyra sp. (acești cromozomi policentrici mari rezultă din alipirea cromozomilor mici, monocentrici; dar ei se pot dispersa în cromozomi mici, monocentrici spre a da serii poliploide multiple, care de fapt reprezintă fenomene pseudopoliploide).

Agmatopseudopoliploidia este o formă de pseudopoliploidie care caracterizează speciile cu centromeri difuzi, cum sînt de exemplu speciile genului Luzula, care prezintă forme diploide (2n=2x=12) și forme poliploide (6x și 8x) și pseudopoliploide (2n=4x=24 și 2n=8x=48). Pseudopoliploizii au cromozomi de două ori mai mici decît cromozomii formelor diploide, ceea ce denotă originea lor prin fragmentarea cromozomilor formei diploide. La hibrizii dintre formele diploide și cele pseudopolidiploide, în meioză apar interesante conjugări între cromozomii de lungime normală ai formei diploide și cromozomii mici, omologi cu aceștia, rezultați prin fragmentarea lor de la formele pseudopoliploide. Desigur în acest caz meioza decurge cu evidente dereglări.

La organismele apomictice, meioza se caracterizează printr-un grad înalt și constant de asindeză și apariția nucleilor de restituție care se formează la orice stadiu după diakineză. Apar astfel microspori nereduși. La formele cu apomixie facultativă, se înregistrează o trecere de la meioză la mitoza gametofitică.

Capitolul X

INFLUENȚA FACTORILOR MUTAGENI ASUPRA DIVIZIUNII CELULARE

1. FACTORII FIZICI — RADIAȚII IONIZANTE

Primele observații privind influența radiațiilor asupra diviziunii celulare au fost efectuate chiar de către descoperitorul radioactivității uraniului, H. Becquerel. Cercetările lui Bergonié și Tribondo au dus la concluzia că radiosensibilitatea celulelor este direct proporțională cu capacitatea lor de proliferare și invers proporțională cu gradul de diferențiere.

Rezultă de aici că celulele cu înmulțire rapidă, din compartimentul proliferativ, sînt foarte sensibile la iradiere, pe cînd cele din compartimentul diferențiator prezintă o rezistență mai mare la radiații.

Sînt însă unele celule care, deși nu se divid, sînt foarte sensibile la iradiere. Radiosensibilitatea variază în funcție de specie. Radiosensibilitatea maximă se evidențiază în perioada ce precede diviziunea propriu-zisă, adică în etapa replicării materialului genetic. În funcție de stadiul în care intervine iradierea apar aberații cromozomale de diferite tipuri. Cînd iradierea se produce în stadiul presintetic (G_1), stadiu în care cromozomul se află în faza 2 C, se produc aberații de tip cromozomal, iar la locul de rupere a cromatidelor se realizează un schimb de fragmente cromozomale. Dacă însă iradierea s-a realizat în faza S sau G_2 (sintetică sau postsintetică), cînd cromozomul se află în stadiul de 4 C, apar aberații de tip cromatidic, adică la nivelul cromatidei. Dacă iradierea se produce în timpul diviziunii, în profază bunăoară, apar aberații de tip subcromatidic, la nivelul jumătății de cromatidă (N. P. Dubinin, 1971). Sub influența radiațiilor apar mutații, care în cea mai mare parte sînt letale, numeroase celule fiind astfel eliminate. Aceste mutații sînt cromozomale și genice. Cele mai importante pentru diviziune sînt aberațiile cromozomale, ele modificînd morfologia cromozomului și comportamentul său mitotic și meiotic.

După Drake, mutațiile induse sînt de două categorii: microleziuni sau mutații punctiforme și macroleziuni sau aberațiile cromozomale.

Microleziunile au la bază înlocuirea unei baze azotate cu o altă bază azotată care după Freese poate fi dată de tranziție (înlocuirea unei baze purinice cu o altă bază purinică — A cu G sau G cu A — sau a unei baze pirimidinice cu o altă bază pirimidinică — T cu C sau C cu T) și transversie (înlocuirea unei baze purinice cu o bază pirimidinică — A — C sau a unei baze pirimidinice cu o bază purinică T — G) și adiția sau deleția unei perechi de baze azotate („frameshift mutations") stau la baza micromutației.

Macroleziunile sau aberațiile cromozomale sînt de două feluri: deleția și duplicația, pe de o parte, și rearanjamentele cromozomale pe de altă parte adică inversiile și translocațiile.

Aberațiile cromozomale apar în urma fenomenului de rupere-reunire. În urma acestui fenomen se produce fie restituția adică refacerea configurației inițiale a cromozomului, fie că apar la nivelul capetelor rupte leziuni acromatice care se numesc „gaps" („goluri"). Aceste gaps-uri apar mai ales din unirea a două leziuni vecine. Aberațiile cromozomale sînt schimbări structurale în care unitatea de aberație este cromozomul întreg adică sînt modificate ambele cromatide, în loci identici. Aberațiile cromatidice sînt schimbări structurale în care unitatea de aberație este cromatida.

Aberațiile subcromatidice sînt acelea în care unitatea afectată de aberație este subcromatida (unitatea fibrilară).

Teoria lui Sax și Lea admite că aberațiile cromozomale apar în urma străbaterii cromozomului de către traiectoria particulelor ionizante sau ca urmare a trecerii acestora prin spațiul imediat pericromozomal. Ulterior s-a dovedit că nu este necesară străpungerea cromozomului de către fluxul radiațiilor, fiind necesară doar ionizarea în vecinătatea imediată a cromozomului. Dar încă mai sînt unele incertitudini în aprecierea exactă a efectului iradierii de vreme ce aceleași aberații cromozomale pot fi induse cu ajutorul mutagenilor chimici.

În urma iradierii se remarcă modificări în comportamentul mitotic sau meiotic al cromozomilor. Cromozomii devin „lipicioși" și în această stare, deplasarea lor spre poli este îngreunată. Repartizarea neuniformă a cromozomilor în mitoză în urma iradierii este determinată de distrugerea fusului, pe de o parte, și de alipirea cromozomilor în urma restructurărilor cromozomale, pe de altă parte. Apare fenomenul de nondisjuncție cromozomală care duce la repartizarea neechilibrată a cromozomilor spre poli.

Mai evidente și ușor decelabile microscopic sînt fragmentările cromozomale, cromatidice și subcromatidice. Cînd are loc iradierea în stadiul G_1 (cromozomul este sub formă de 2 C), fragmentarea unei cromatide se poate transfera la cealaltă cromatidă. În urma tratamentului cu radiații ionizante apar punți subcromatidice care determină dereglarea meiozei. Punțile sînt rezultatul unei fragmentări izo-locus a cromatidelor nesurori cu reunire inversă sau de tip U ca și rezultatul schimbului dintre cromatide surori combinat cu crossing-over cu cromatida apropiată nesuroră (B. E. Brandham, 1970). Dacă asupra catenei de ADN, modificată structural sub influența iradierii, acționează o categorie specială de fermenți de reparație, are loc înlăturarea porțiunii modificate și replicarea, cu folosirea catenei omoloage nealterate drept matriță, refăcîndu-se o moleculă normală de ADN. Dacă acești fermenți de reparație nu acționează la locul la care s-a produs alterarea structurală, apare o aberație de nivel cromozomal. Fragmentarea cromozomului este evidențiată în metafază, cînd lungimea cromozomilor este micșorată. Fragmentele cromozomale acentrice se pot desprinde din cromozom și dau micronuclei spre sfîrșitul diviziunii, mai ales în meioză, unde apariția diadelor și tetradelor cu micronuclei este un semn sigur al dereglării meiozei. Aceste fragmente cromozomale acentrice nu pot migra spre poli în condiții normale, folosind aparatul mitotic. Ele sînt împinse spre poli prin curenți citoplasmatici. Ajungînd la poli, se pot include în masa nucleilor fii sau rămîn independente în citoplasmă, dînd micronuclei sau cariomere.

Cînd fragmentul desprins din cromozom se alipește în poziția inițială la cromozom, fenomenul se numește restituție.

Cînd fragmentul se desprinde din capătul unui cromozom din porțiunea terminală și nu mai revine, fenomenul se numește deleție terminală. Poate fi și deleție intercalară. Prin atașarea unui fragment, de la cromozomul pereche, desprins prin deleție, la omologul său, apare duplicația. Dacă are loc atașarea unui fragment de cromozom neomolog la un cromozom, fenomenul se numește adiție. Atît adiția cît și duplicația pot fi remarcate microscopic prin mărirea lungimii cromozomului metafazic. Prin deleție, lungimea cromozomului metafazic se micșorează.

Un caz deosebit de restituție este inversia pericentrică sau paracentrică. În acest caz, fragmentul desprins se alipește la locul său după ce a efectuat o rotire de 180°, încît are loc schimbarea ordinii inițiale a genelor (din abc în cba).

Prin translocație simplă se poate atașa un fragment de cromozom la un cromozom omolog sau neomolog și apare în urma unei duble fragmentări a cromozomului. În cazul translocației reciproce are loc un schimb egal, reciproc, de material genetic, între doi cromozomi (un schimb de fragmente în ambele direcții) și dacă acest lucru are loc la cromozomi omologi în timpul fenomenelor sinaptice ale meiozei, este un crossing-over obișnuit. Cînd translocația reciprocă implică doi cromozomi neomologi, apare un crossing-over nelegitim. Aceste aberații cromozomale afectează diviziunea, mai ales pe cea meiotică, în care aceste remanieri cromozomale sînt ușor de evidențiat în cadrul fenomenelor de conjugare a cromozomilor (fenomene sinaptice) din profaza I. De obicei conjugarea cromozomilor omologi este modificată, deoarece aceste remanieri cromozomale, modificînd ordinea genelor și cantitatea genelor, alterează gradul de omologie dintre cromozomii omologi (Fig. 116 și 117).

În meioză, în cadrul fenomenelor sinaptice, în condițiile prezenței remanierilor cromozomale apar configurații specifice mai ales în cazul translocațiilor, cînd se formează caracteristice inele de translocație.

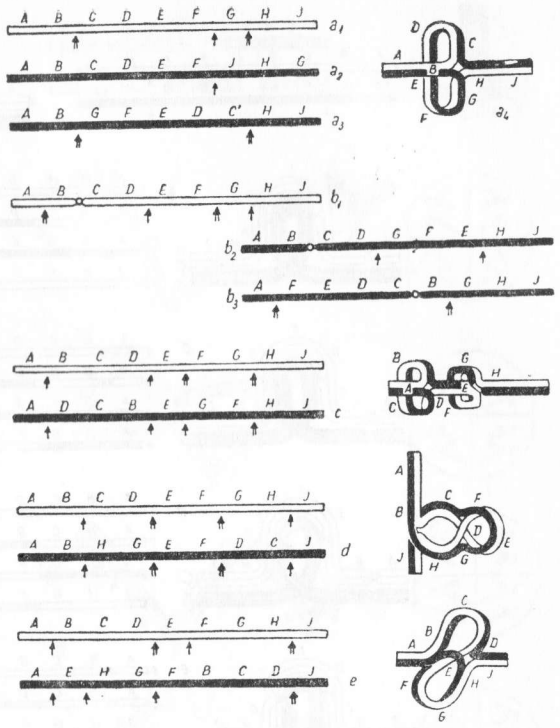


Fig. 116 — *Apariția buclelor de inversie la cromozomii asociați în meioză.* a_1 — cromozom ce prezintă o secvență normală de gene; a_2 — inversie terminală (locul de rupere este indicat prin săgeată simplă); a_3 — inversie intercalară (locurile de rupere sînt indicate prin săgeți duble; a_4 — bucle de inversie în perechi între a_1 și a_3; b_1 — secvență normală; b_2 — inversie paracentrică (locurile de rupere indicate prin săgeți simple); b_3 — inversie pericentrică (locurile de rupere indicate cu săgeți simple); c—d — inversii complexe și buclele de împerechere corespunzătoare heterozigoților prin inversare (locurile de rupere la prima inversie indicate prin săgeată simplă; iar la a doua prin săgeată dublă); c — buclă de inversie dublă, independentă; d — buclă de inversie închisă; e — buclă de inversie suprapusă (din O. Hess, 1973).

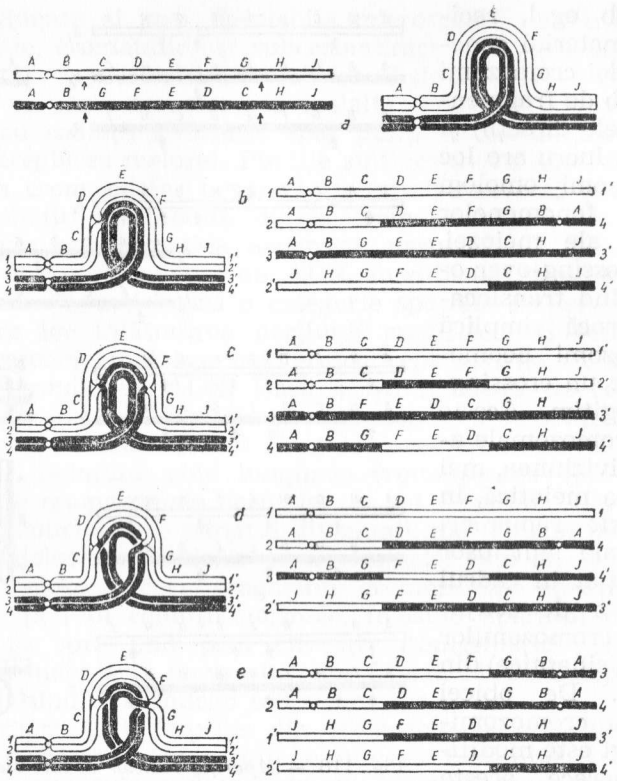


Fig. 117 — *Consecința schimbului în cazul unei inversii heterozigote paracentrice. a* — inversie cu locurile de rupere și buclele de împerechere; *b* — schimb simplu; cromatidele 1 și 1′ și 3—3′ normale, 2—4 — dicentrice (formează o punte anafazică în diviziunea următoare, deficiente pentru AB, duplicate pentru H. J.; *c* — schimb dublu, toate cromatidele normale; *d* — schimb dublu între trei cromatide, cromatidele 1—1′ și 3—4′ normale, cromatidele 2—4 dicentrice, deficiente pentru H, J duplicate pentru A, B; cromatidele 2′—3′ acentrice, deficiente pentru AB, duplicate pentru H, J.; *e* — schimb dublu pentru patru cromatide. Cromatidele 1—3 și 2—4 dicentrice, deficiente pentru H, J, duplicate AB; cromatidele 1′—3′ și 2′—4′ acentrice, deficiente pentru AB, duplicate pentru H, J (din O. Hess, 1973).

Translocațiile în stare heterozigotă duc la formarea de asociații cromozomale în formă de cruce în pachiten (Fig. 118). Dacă se formează chiasme în fiecare din brațele împerecheate, rezultă un inel format din patru cromozomi în diachineză și metafaza I. Cînd translocarea include doar o mică parte din lungimea cromozomului, se formează un lanț deschis alcătuit din 4 cromozomi.

Translocațiile au efecte asupra fenotipului, interpretate ca efecte de poziție, fiind adesea asociate cu mutații biochimice. La om, de exemplu, mongoloidismul este urmarea, pe lîngă trisomia perechii 21, și a unei translocații între cromozomii 15 și 21, iar leucemia apare ca urmare a unei translocații între cromozomii perechilor 9 și 21.

Din cauza alterării gradului de omologie, cromozomii din omologi devin parțial omologi sau neomologi. Așa se explică apariția cromozomilor uni-

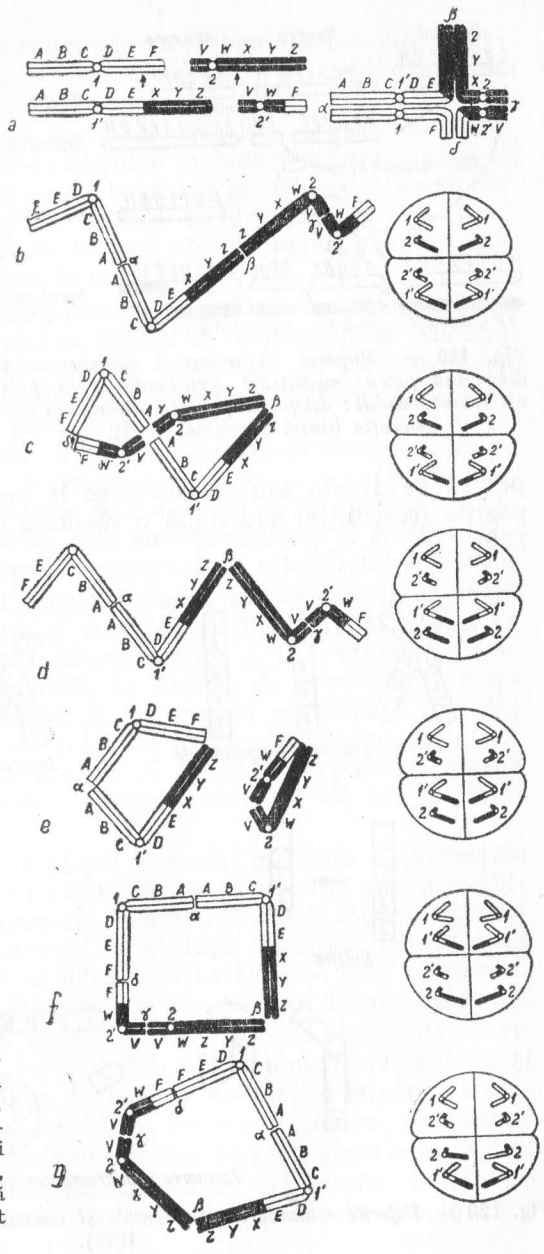


Fig. 118 — *Translocația reciprocă. a* — translocație cu puncte de rupere și cu legăturile de unire a două cromatide în heterozigotul de translocație; *b—g* — posibilitățile încadrării legăturilor în metafaza I dependente de poziția centromerilor și a chiasmelor. Posibilitățile de distribuire în gameți a cromozomilor translocați și a celor neafectați de translocație. În *b* și *c* gameții au secvențe normale de gene pe cînd în *d* și *g* au duplicații γ, β, γ, ∂ — puncte terminale ale perechilor omoloage de segmente. Numai acolo unde se află o chiasmă, perechea rămîne și în prometafază respectiv în diachineză în contact (din O. Hess, 1973).

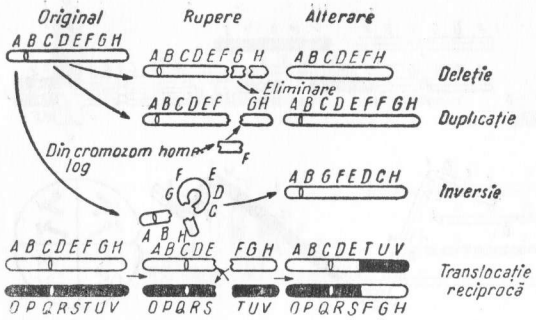


Fig. 119 — *Ruperea și reunirea cromozomului determină patru modificări structurale principale ale cromozomului : deleția, duplicația, inversia și translocația* (după Stebbins, 1971).

valenți neîmperecheați, apariția retardatarilor în A_I sau T_I, a punților cromozomale, a micronucleilor etc. Uneori, din cauza alterării gradului de omologie a cromozomilor, pot să apară asocieri multivalente de cromozomi în meioză.

În multe cazuri, fragmentele cromozomale apărute în urma iradierii se pot pierde în carioplasmă sau citoplasmă. Alteori, ele rămîn independente și pot să se dividă sau se realipesc la cromozomul inițial în aceeași poziție (restituție) sau după o răsucire de 180° (inversie) (Fig. 119, 120).

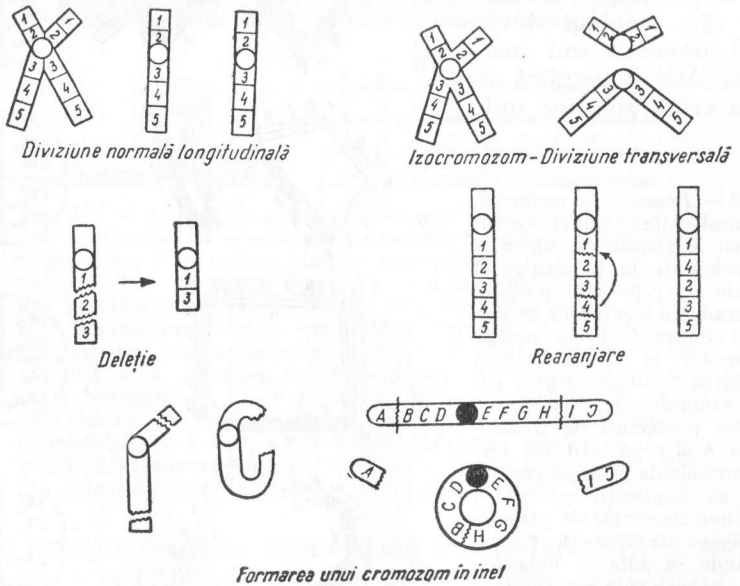


Fig. 120 — *Diferite remanieri cromozomale și consecințele lor genetice* (după Patau, 1971).

Influența radiațiilor asupra sistemelor meiotice a constituit obiectul unui simpozion organizat, la Viena, în 1967, de către International Atomic Energy Agency.

Se știe că radiațiile ionizate au efect dăunător asupra materialului ereditar. Studiul efectelor radiațiilor ionizante asupra sistemului meiotic a scos în evidență gama largă de modificări apărute în desfășurarea gametogenezei și în același timp faptul că se obțin efecte similare asupra unor foarte variate obiecte experimentale, începînd de la alge și fungi și pînă la mamifere și om.

Studiind efectul radiațiilor în gametogeneză, la mamifere, E. F. Oakberg (1968) a scos în evidență faptul că răspunsul la iradiere apare în diploten și în stadiile meiotice ulterioare în gametogeneza femelă. În gametogeneza masculă, după iradiere, crește frecvența celulelor care degenerează în timpul diviziunii meiotice, crește frecvența punților și a fragmentelor. Crește de asemenea frecvența spermatidelor, cu variate grade de heteroploidie. Apar anafaze anormale, datorită fragmentării cromozomale, translocației și formării de fragmente acentrice. Cel mai sensibil este stadiul diakinezei și apoi metafaza I, iar cel mai puțin sensibil apare a fi stadiul de leptoten.

Studiul efectului iradierii cronice asupra ovogenezei la șoarece, efectuat de către A. G. Searle și R. J. S. Phillips (1968) a scos în evidență faptul că sensibilitatea cromozomilor X la iradiere, în desfășurarea ovogenezei, este variabilă, în funcție de proveniența acestora. Sensibilitatea cromozomului X de origine maternă a fost cea mai înaltă în fazele finale ale celei de a doua diviziuni meiotice, pe cînd sensibilitatea cromozomului X de origine paternă sau a lui Y a fost diferită de aceea a cromozomului X de origine maternă.

Iradiind ovule de Drosofila aflate în stadii meiotice și postmeiotice, F. E. Würgler (1968) a constatat că cea mai înaltă radiosensibilitate corespunde regiunii nucleare. Efectele iradierii asupra nucleului sînt diferite, de la inducerea de mutații specifice (translocații sexlinkate și reciproce) pînă la letalitate. Letalitatea este rezultatul anomaliilor cromozomale induse radioactiv precum fragmentarea și fuziunea cromozomală, punți cromozomale. Apar de asemenea translocații în cadrul genomului matern, în cadrul genomului patern și între genomul matern și patern, în funcție de stadiul la care se realizează iradierea. Translocațiile între genomul patern și matern apar atunci cînd iradierea ovulelor are loc în faza pro-nucleară sau în apropierea acesteia. Radiosensibilitatea în diviziunile de clivare poate fi corelată cu numărul de nuclei iradiați și cu stadiile de diviziune nucleară.

Apariţia translocaţiilor reciproce între cromozomul 2 şi unul dintre cromozomii 6—12 la om determină o desfăşurare anormală a spermatogenezei (J. Lindsten, 1968) cu apariţia în diachineză a unui tetravalent caracteristic.

La Chlamydomonas reinhardi, D. R. Davies (1968) a arătat că sensibilitatea la iradiere este diferită la un stadiu ce se află înainte de profaza meiotică şi în stadiul profază-metafază. Sensibilitatea la iradiere în cazul acestei alge verzi unicelulare este în funcţie şi de fotoreactivaţie. Mai rezistente s-au dovedit stadiile tîrzii ale profazei. La aceeaşi specie, C. W. Lawrence (1968) constată că iradierea gamma influenţează recombinarea la numai două scurte stadii în cursul meiozei (la Chlamydomonas reinhardi meioza are loc la germinarea zigosporului uninucleat şi este în esenţă asemănătoare cu aceea de la plantele superioare). Stadiul 1, la care frecvenţa de recombinare descreşte, apare în preleptoten şi durează 10—15 minute. În stadiul 2, frecvenţa de recombinare creşte şi acesta apare în pachiten. Dozele mari de radiaţii descresc frecvenţa de recombinare în toate stadiile pînă la pachiten. Acest efect al iradierii asupra frecvenţei de recombinare este legat de sinteza ADN-ului. Recombinarea genică şi alelică după datele genetice, are loc în două etape, cea finală fiind în pachiten.

Fenomenele reparatorii spontane ce apar în urma leziunilor cromozomale induse radioactiv determină întîrzierea diviziunii. În cadrul proceselor reparatorii se consumă ATP şi hexoze (R. M. Klein şi D. T. Klein, 1971).

În urma iradierii X sau U.V. se rup lanţurile şi se alterează structura bazelor specifice. Dar aceste alterări uneori sînt reparate înainte de a se exprima. Sub acţiunea U.V. iau naştere dimeri timină-timină prin absorbirea U.V. de către două molecule de timină adiacente. Acest rezultat este letal, căci moleculele de timină fuzionate nu pot funcţiona ca matriţă corectă. Dar intervin enzime reparatoare care scot regiunea lezată din macromolecula de ADN. În acest proces reparator, endonucleazele joacă un rol esenţial. Exonucleazele apoi îndepărtează prin digestie nucleotidele vecine secţiunii realizată de endonuclează la nivelul dimerului. Apoi, la regiunea monocatenară rezultată, se ataşează nucleozid —5′ — trifosfaţi, care, prin intermediul enzimei ADN-polimeraza, sînt legaţi de capătul 3′ al unui fragment de lanţ adiacent. Apoi o enzimă de unire, numită nucleotidligaza, reface unitatea macromoleculei de ADN.

Prin iradierea X, cu 750 R, a polenului de mazăre, apar cromozomi dicentrici (Fig. 121) (F. Saccardo, 1971), care dau forme de cruce sau de punţi paralele duble în anafază.

În urma iradierii X, la Chratogonus incertus (Acrididae) M. D. Srivastava şi K. S. Bachher (1966) evidenţiază apariţia variatelor aberaţii cromozomale. La 800 r are loc agregarea cromozomilor în mase mari vacuolizate care se repartizează inegal la spermatocitele secundare. Se remarcă, de asemenea, o fragmentare enormă a cromozomilor. La 400—500 r apar aberaţii moderate, retardatari şi fragmente incomplete.

Sub influenţa razelor gamma apar anomalii mitotice din cauză că cromozomii devin lipicioşi, se aglomerează, apar fragmente şi punţi, translocaţii, anomalii fusoriale nondisjuncţia cromozomilor, granulaţii la nivelul cromozomilor. Fig. 122).

Anomalii asemănătoare apar şi în meioză la Oryza sativa, (A.Y. Rej şi colab., 1972). În urma translocaţiilor apar inele de cromozomi. Procentul de aberaţii cromozomale creşte paralel cu creşterea dozei de iradiere. Punţile pot fi simple, duble, triple şi multiple, punţi în X (Fig. 123). Apar fragmente centrice şi accentrice şi retardatari în anafază. (Fig. 124).

Uneori, în diachineză, sub influenţa iradierii s-au remarcat fragmentarea nucleolului, interschimburi complexe, inele. Cu trecerea generaţiilor, aceste anomalii cromozomale sînt eliminate. Apariţia univalenţilor rezultă din neîmperecherea cromozomilor care au pierdut omologia datorită translocaţiilor inversiilor sau deleţilor. Multivalenţii apar în urma împerecherii neregulate datorită translocaţiei şi inversiilor. Inelele sînt de asemenea rezultatul translocaţiilor. Fragmentele din afara plăcii ecuatoriale sînt acentrice. Punţile simple şi duble în A_1 reprezintă cromatide dicentrice sau cromozomi dicentrici şi pot fi şi o consecinţă a crossing-overului dintre segmentele răsucite reciproc.

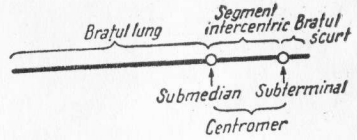


Fig. 121 — *Schema cromozomului dicentric* (după John şi Lewis, 1965).

Fig. 122 — *Influenţa iradierii gamma asupra diviziunii la Vinca rosea L.* *1—3* celule radiculare în anafază, prezentînd dereglări, anafază cu un lanţ de cromozomi în jurul fusului (2) sau în afara fusului (3) (25 000 R); *4—6* — anafaze cu cromozomi translocaţi, rămaşi ca retardatari (30000 R); *7* — anafază cu grupe de cromozomi în afara polilor (35 000 R); *8, 9—11* — anafază cu cromozom ailipiţi la poli şi cu retardatari (9 şi 11) şi cromozomi ataşaţi şi proiectaţi din masa lipicioasă de la poli cu (8) (30 000 R). *10, 12* — 35 000 R); *13—18* — anafaze cu punţi de diferite tipuri (după I. V. Sadhakaran, 1972).

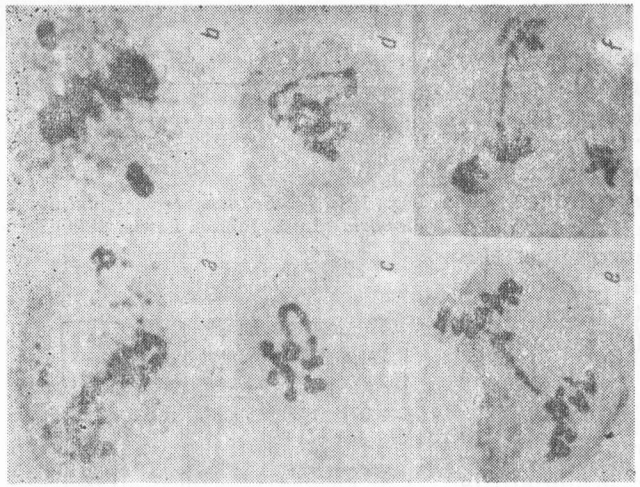


Fig. 124 — *Consecințele iradierii asupra meiozei la Vicia ervilia* (plante în prima generație de la iradiere). *a* — diachineză timpurie cu fragmentarea nucleolului (50 Kr.); *b* — fragmente ieșite din placa ecuatorială a metafazei I (25 Kr.); *c* — o posibilă translocație ce implică 4 cromozomi (50 Kr.); *d* — configurații complexe ce au la bază translocații (30 Kr.); *e* — anafaza I cu o punte cromatidică (10 Kr.); *f* — anafaza II cu punte și fragmente (după M. A. Q. Shaikh și M. B. E. Godward, 1972).

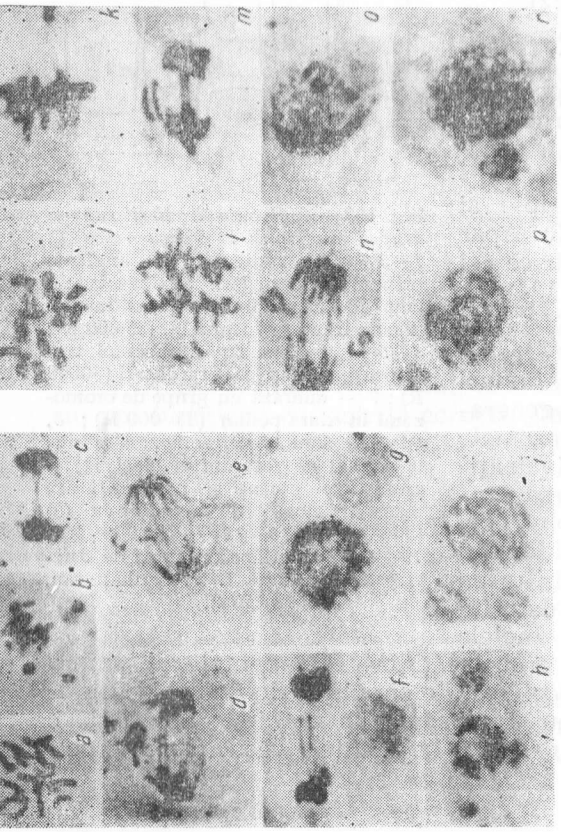


Fig. 123 — *Consecințele fragmentării cromozomilor, prin iradiere, în timpul diviziunii, la Lathyrus sativus și Vicia ervilia. a—i* — în celulele de tip radicular de Vicia ervilia; *a* — placă metafazică somatică cu 14 cromozomi la plante martor (neiradiate); *b* — metafază cu fragmente (50 Kr); *c* — anafază cu punți incrucișate (10 Kr) *d* — anafază cu punți interlocus, fragmente și retardatari (30 Kr); *e* — anafază cu punți multiple,fragmente și retardatari (25 Kr); *f* — anafază cu o pereche de retardatari (30 Kr); *g* — interfază cu micronuclei „condensați" și „necondensați" (50 Kr.); *h* — micronuclei ce par a fi intrat în profază alături de nucleul principal (15 Kr.); *j—r* — consecințele iradierii la Latyrus sativus: *j* — placă metafazică la plantele neiradiate (martor); *k* — fragmente de cromozomi în afara plăcii ecuatoriale; *l* — anafază cu punți încrucișate, fragmente și micronuclei; *m* — anafază cu punți perechi și retardatari; *n* — anafază cu punți, un inel, fragmente și retardatari; *o* — fragmente în formă de „V" încorporat în nucleu interfazic; *p* — micronucleu intrat în profază în același timp cu nucleul principal; *r* — interfază cu micronuclei „condensați" și „necondensați" (X 1875), după M. A. Q. Shaikh și M. B. E. Godward, 1972).

2. FACTORII CHIMICI MUTAGENI

Condițiile de apariție a mutațiilor sub acțiunea agenților chimici mutageni nu se deosebesc fundamental de cele ale apariției mutațiilor sub influența iradierii. Și în cazul acțiunii factorilor chimici mutageni cele mai sensibile faze ale diviziunii celulare sînt interfaza (perioada cînd se desfășoară evenimentele reproductive ale ciclului celular) și profaza. Cînd acționează în G_1 sau S, cu specificitate, agenții chimici inhibă replicarea cromozomilor acționînd asupra sintezei ADN-ului. Cînd acționează în G_2 sau profaza timpurie, agenții chimici afectează formarea cromatidelor libere, căci acestea sînt faze în care cromozomii sînt replicați.

Unii agenți chimici mutageni sînt analogi ai bazelor azotate, cum sînt 5-bromuracilul și 2 amino-purina. Acești agenți chimici mutageni duc în final la înlocuirea unei perechi de baze azotate cu o altă pereche de baze azotate, adică determină tranziții:

$$AT \text{ ——— } GC \text{ sau } GC \text{ ——— } AT$$

Alți agenți chimici afectează sinteza și metabolismul acizilor nucleici. Astfel, azaserina, adenina, aminopterina etc., determină inhibiția sintezei ADN-ului și a precursorilor săi. Agenți alkilanți, mitomicina C, actinomicina D, hidrazida maleică etc., modifică caracteristicile chimice și fizice ale ADN-ului.

Precursorii adeninei și guaninei precum hipoxantina și respectiv xantina, acționează la nivelul fusului nuclear și a centromerilor, ducînd la apariția de celule tetraploide și de cromozomi retardatari. Derivații uracilului precum 4 (6) aminouracilul acționează asupra cromozomilor (chiar și asupra celor din stadiul G_1, deci nereplicați) producînd leziuni cromozomale mai ales în regiuni heterocromatice. Compușii aza — ai adeninei, guaninei și timinei, sînt puternici inhibitori ai diviziunii celulare.

V. Stoian (1973), studiind efectul adeninei asupra diviziunii celulare, la Vicia faba, remarcă efectul puternic inhibitor al acesteia, constatînd că adenina are efect de tip radiomimetic producînd aberații cromozomale de tip cromatidic cu o frecvență foarte mare. Astfel, apar 10,8% anafaze anormale la o concentrație de 0,1% adenină și 31,6% aberații la concentrația de 0,2% adenină. Aceste aberații sînt reprezentate de punți cromatidice, fragmente de cromozomi, micronuclei, cromozomi eliminați, celule binucleate. Frecvența mare a fragmentelor este un semn al aberațiilor izocromatidice. Se consideră că adenina inhibă biosinteza purinică.

Efectele acestor agenți chimici mutageni, influențînd mitoza și proprietățile acizilor nucleici acționează direct asupra cromozomi-

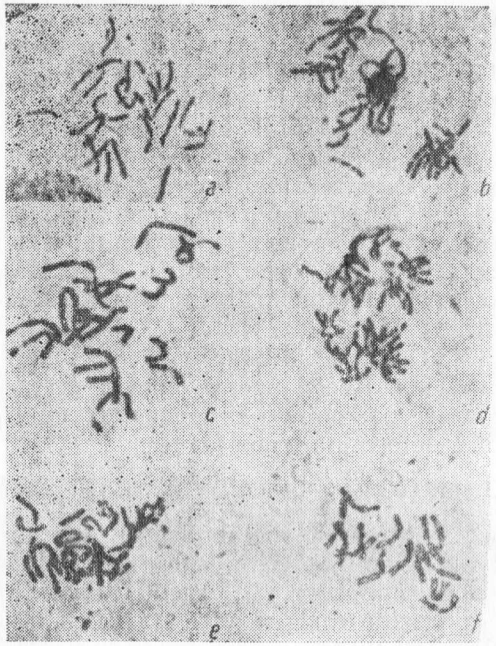


Fig. 125 — *Influența substanțelor chimice mutagene asupra diviziunii celulare* (după A. K. Sharma și B. Varma, 1959). *a* — eroziunea și fragmentarea cromozomilor în urma tratamentului cu soluție saturată de fluoroglucinol, timp de 5 ore; *b* — eroziunea cromozomilor și alungirea centromerului cu fragmentare incipientă a cromozomilor în urma acțiunii fluoroglucinolului în soluție semisaturată, timp de 5 h; *c* — eroziunea și fragmentarea cromozomilor produse în urma tratamentului timp de 5 h cu 8 — hidroxichinoleină; *d* — fragmentarea cromozomilor și alungirea centromerului după 21 de ore de tratament cu soluție semisaturată de 8-hidroxichinoleină; *e* — alipire, colorare intensă și alungirea centromerului în urma tratamentului cu 8-hidroxichinoleină, timp de 4 ore, în soluție 1/4 saturată; *f* — eroziunea cromozomilor și apariția diplocromatidelor în urma unui tratament de o oră cu soluție saturată de Resorcinol.

lor (Fig. 125) modificîndu-le caracteristicile în timpul diviziunii, determinînd la aceștia un comportament anormal. Compușii purinici determină cel mai frecvent prelungirea duratei ciclului mitotic.

Unele substanțe chimice, fără a influența asupra sintezei și proprietăților ADN-ului și replicației cromozomilor acționează asupra fusului de diviziune căruia îi inhibă activitatea, blocînd diviziunea celulară, din care cauză aceste substanțe se numesc statmochinetice. Cea mai cunoscută substanță chimică din acest grup este colchicina. Efect statmochinetic au de asemenea α — bromnaftalena, α — clornaftalena, și α — iodnaftalena ca și multe alte substanțe.

Colchicina este un alcaloid extras din brîndușa de toamnă (Colchicum autumnale) și este unul din cei mai folosiți prefixatori în cadrul metodelor citologice de evidențiere a cromozomilor. Se prepară și sintetic. Reprezintă un derivat amilat și metaxilat al fenantrenului. Are culoare galbenă și este fotolabilă și termolabilă. Are formula chimică $C_{22}H_{25}NO_6$. Se folosește în soluții apoase spre a provoca statmochineza (blocarea formării fusului de diviziune) sau poliploidizarea. Acțiunea colchicinei a fost descoperită în 1936, de către B. J. Ludford la celulele animale și de către A. F. Blakeslee

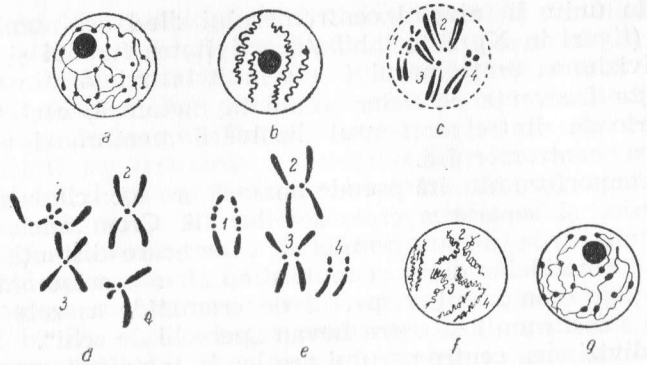


Fig. 126 — *C-mitoza sau mitoza desfășurată sub influența colchicinei. a* — nucleu interfazic; *b, c* — desfășurarea normală a profazei cu individualizarea a două cromatide, cu scindarea longitudinală a fiecărui cromozom (de la 1 la 4) și dispariția membranei nucleare și a nucleolului; *d* — statmo-metafază (pseudometafază), colchicina inhibă formarea fusului, cromatidele se repartizează dezordonat. Ele sînt unite la nivelul centromerilor și dispuse în formă caracteristică de X; *e* — statmo-anafază (pseudoanafază) în care are loc clivarea cromozomilor, iar cromozomii fii prezintă o dispoziție paralelă; *f* — statmo-telofază (pseudotelofază) în care reapare membrana nucleară, iar cromozomii regresează. *g* — nucleu interfazic, poliploid, cu număr de cromozomi dublat prin statmochineză (după A. Nougaréde, 1969).

și A. G. Avery, în 1937, la celulele vegetale. Efectele citologice ale colchicinei au fost studiate de către A. Levan și le-a generalizat sub denumirea de C-mitoză și C-meioză (mitoza, respectiv meioza sub influența colchicinei).

Sub acțiunea colchicinei, pînă la sfîrșitul profazei nu se observă nici o modificare la celulele colchicinizate. La sfîrșitul profazei însă, colchicina acționează statmocinetic, împiedicînd formarea fusului de diviziune. Celelalte faze ale diviziunii apar astfel modificate, neexistînd fus de diviziune, din care cauză modificările diferențiate în comportamentul cromozomilor s-au numit metamorfoze sau pseudofaze. (Fig. 126).

În metamorfoza numită pseudometafază, cromozomii mitotici apar sub forma literei X, cu brațe puternic divergente, acest aspect numindu-se, după Levan, „figuri în X". Cromatidele surori nu mai sînt răsucite una în jurul celeilalte, iar cromozomii, în absența fusului de diviziune, nu se mai dispun într-o placă ecuatorială, fiind răspîndiți în întreaga celulă. Cromatidele au tendința îndepărtării,

dar rămîn unite la nivelul centromerului dînd așa-numita „cross-shaped“ (figuri în X). Este inhibată activitatea fusului și centromerului. Diviziunea centromerului este mult întîrziată, din care cauză se mărește frecvența celulelor aflate în metafază, căci se prelungește perioada dintre momentul dizolvării membranei nucleare și diviziunea centromerului.

În metamorfoza numită pseudo-anafază are loc scindarea regiunii centromerice și separarea cromozomilor fii. Cromatidele anafazice (cromozomii fii) se dispun paralel la o oarecare distanță între ele. Clivarea cromatidelor durează mult timp și este asincronă la nivelul diferiților cromozomi. Aspectul de cromatide așezate paralel și apropiate a fost numit de către Levan „perechi de schi“.

Dacă diviziunea centromerului are loc în metafază, nu mai apare metamorfoza pseudoanafază, fiind o trecere directă de la pseudometafază la pseudotelofază.

În metamorfoza numită pseudotelofază, cromozomii nu migrează spre poli opuși, rămînînd în interiorul unui singur nucleu, numit nucleu de restituție, care este așadar autotetraploid. Dacă în continuare celulele se află pe mediu cu colchicină, are loc o mărire progresivă a gradului de ploidie.

Dacă acțiunea colchicinei este întreruptă, celula recapătă capacitatea de a se divide normal, mitotic, cu formarea fusului de diviziune și cu succesiunea tipică a fazelor. Trecerea de la C-mitoză la mitoza normală este adeseori marcată de apariția diviziunilor multipolare în cadrul cărora apar mai multe grupe de cromozomi care, incluse fiind în nuclei diferiți, se ajunge la reducerea numărului de cromozomi.

Celulele vegetale apar a fi mult mai rezistente (de circa 1 000 ori) la colchicină, față de celulele animale. Din această cauză în aplicarea metodei de evidențiere a cromozomilor la animale, în cadrul operației de prefixare, în loc de colchicină se recomandă folosirea colcemidului (demeo-colchicină) care, cu aceeași eficacitate statmochinetică, poate fi folosit în concentrații mai mici fiind astfel mult mai puțin toxic pentru celulă. Colcemidul este o colchicină la care s-a înlocuit grupul acetilamidă cu un grup metilamino.

La animale nu are loc, spre deosebire de plante, scindarea centromerului înaintea pseudotelofazei.

Colchicina, pe lîngă efect statmochinetic poate avea efect mutagen, determinînd fragmentări de cromozomi.

S-a arătat că colchicina formează un complex molecular cu ADN-ul și uneori apare ca un inhibitor al sintezei proteice, împiedicînd transcripția de către ARN (M. J. Kuzmich și A. N. Zimmerman, 1972). Tratînd cu colchicină anteridii de Nitella, F. R. Turner (1970) a constatat că au apărut variate anomalii în spermatii.

Meioza desfășurată sub influența colchicinei poartă denumirea de C. meioză. În cadrul profazei C-meiozei sînt abolite fenomenele sinaptice așa încît, încă din profază, cromozomii apar sub formă de univalenți sau frecvența bivalenților este foarte redusă. La sfîrșitul profazei dispare membrana nucleară, dar nu apare fusul de diviziune, colchicina acționînd statmochinetic. Cromozomii vor fi din această cauză dispersați în întreaga celulă, în pseudometafază. Univalenții apar sub formă de „figuri în X“ în pseudometafază. În pseudoanafază are loc separarea bivalenților (dacă există), iar cromozomii în X, după clivarea centromerului, apar ca „perechi de schi“, cromozomii fii fiind dispuși paralel. În pseudotelofază, cromozomii se adună la nivelul unui singur nucleu, numit nucleu de restituție. Din această cauză nu se formează o diadă normală, ci un nucleu care are un număr neredus de cromozomi, așa încît printr-o diviziune homotipică se formează o diadă cu celule, în care numărul de cromozomi este în continuare neredus. Gameții rezultați în urma C-meiozei sînt nereduși. Dacă sînt viabili, pot participa la fecundare și din unirea a doi gameți nereduși rezultă un organism autopoliploid. Din unirea unui gamet diploid cu un gamet normal haploid rezultă un organism autotriploid.

Alte substanțe, precum izocolchicina, acenaftenul, cloroformul, au acțiune statmochinetică asemănătoare aceleia pe care o are colchicina. Șocurile termice (diferențele mari de temperatură de la o zi la alta sau de la un anotimp la altul) care se înregistrează în zona platourilor înalte (Pamir) sau în deșerturi, determină fragmentarea fusului de diviziune și apariția formelor poliploide, foarte frecvente în aceste zone. Se poate constata cum, datorită unor cauze deosebite (agenți chimici și fizici) se ajunge la același efect (poliploidizare prin statmochineză).

Alte substanțe cum sînt cele de tip paradiclorbenzen, au același efect de poliploidizare, dar nu prin împiedicarea formării fusului de diviziune, ci prin împiedicarea formării membranei nucleare. Mai mulți nuclei lipsiți de membrană nucleară pot fuziona ulterior într-unul singur, dînd celule poliploide. Modificările care apar în urma acțiunii agenților fizici și chimici asupra diviziunii celulare determină o desfășurare anormală a acesteia și duc la o repartizare neechilibrată a cromozomilor în celulele fiice.

Studiind efectele p — DL — fluorofenilalaninei asupra mitozei și fusului mitotic, Sisken (1972) a constatat că această substanță determină creșterea duratei metafazelor la celulele Hela, apărînd în

același timp un blocaj metafazic prelungit și uneori ireversibil. De asemenea s-au evidențiat anomalii în fusul de diviziune.

Quinoleina (8-hidroxichinoleina) în soluție saturată (0,46 M) distruge progresiv fusul și fibrele astrale, cromozomii fiind imobilizați în poziție ecuatorială, putînd suferi o transformare telofazică, devenind cariomere. De asemenea, sub influența acestei substanțe apar mitoze monopolare și telofaze monopolare cu cromozomi dispuși în rozetă. După Tjio și Levan, 8-hidroxichinoleina acționează asupra fusului, disociindu-l, asupra centromerului, asupra eucromatinei și heterocromatinei pe care le diferențiază mai mult, accentuează contracția cromozomilor și produce leziuni cromozomale asemănătoare celor produse de agenții alchilanți.

Agenții mutageni chimici ca și radiațiile induc aberații, în special în regiuni heterocromatice așa cum au observat la Vicia faba, Kihlman, Evans și Bigger.

Unul dintre cei mai importanți factori care influențează producerea și distribuția aberațiilor cromozomale sau cromatidice este organizarea cromozomilor în nucleul interfazic cînd are loc replicarea ADN-ului și repararea leziunilor induse chimic sau radioactiv (Natarajan și Ahnström, 1969). În regiunile heterocromatice, repararea leziunilor este adesea aberantă. Tot în regiunile heterocromatice se admite că apar și aberațiile cromozomale spontane. După Darlington prezența heterocromatinei a facilitat evoluția cariotipului prin producerea aberațiilor cromozomale. După Swanson, heterocromatina permite un grad mai mare de variabilitate față de sistemul eucromatic caracterizat printr-o inflexibilitate mai mare.

În urma acțiunii 8-azaguaninei la mazăre, s-a constatat că apar mitoze cu diplocromozomi (cromozomi tetracromatidici) și cuadruplocromozomi (cromozomi 8-cromatidici). Este, așadar, un efect de endoreduplicație, adică o reproducere cromonemală supranumerară, care determină poliploidizarea celulelor (endopoliploidie).

Efectul imediat al 8-azaguaninei este împiedicarea nucleilor interfazici aflați în G_2 de a intra în diviziune și abolirea diviziunii în urma unui tratament de 12 h. De asemenea, 8-azaguanina poate împiedica trecerea celulei din faza G_1 în faza S.

Urmărind efectul combinat al iradierii, hidroxilaminei și etilmetansulfonatului asupra cromozomilor meiotici, Srinivasachar și Mohandas (1971) au constatat că are loc o reducere a frecvenței tetravalenților (apăruți în urma iradierii gamma) de la 22,03 la 1,81%, hidroxilamina înhibînd reunirea și restituția fragmentelor cromozomale. Etilmetansulfonatul, care acționează asupra perechii G-C, ca și hidroxilamina, acționează ca un inhibitor al restituției

și reunirii, determinînd scăderea frecvenței tetravalenților la Pennisetum typhoides, de la 22,03% la 10,66%.

Cercetările efectuate la Vicia faba, au arătat că latirogenii provoacă fragmentarea cromozomilor atît în regiunile heterocromatice, cît și în cele eucromatice, acești agenți interferînd cu metabolismul ribonucleoproteinelor. Datorită fragmentărilor cromozomale este indusă neomologia cromozomilor și apare împerecherea neregulată a cromozomilor. Apar de asemenea amestecuri de cromozomi, celule bi și trinucleate, cromozomi ce nu se includ în placa metafazică, de unde se deduce că latirogenii afectează și fusul de diviziune. În mitoză și meioză apar punți anafazice datorită alipirii cromozomilor sau formării de cromozomi dicentrici, rezultați în urma ruperii și reunirii. Retardatarii în T_I și T_{II} duc la formarea de diade respectiv tetrade cu micronuclei.

Arcara și Ronchi (1967) au constatat că alcoolul etilic, în concentrație de 0,4%, timp de 4 h, induce o întîrziere a diviziunii cu 13 h. Faza S este întîrziată cu 6 ore, iar faza G_1 cu 7 h.Faza G_2 ca și profaza nu sînt afectate de tratament.

Bobák (1966) constată că la Vicia faba, laurilalcoolul determină citomixii mitotice și aberații cromozomale cu formare de micronuclei.

Olah și Bazzola (1972), studiind efectul digitoninei asupra diviziunii celulare, constată că aceasta, asemănător colchicinei, are efect statmochinetic, neinterferînd însă cu sinteza ADN-ului sau ARN-ului.

Studiul efectului citologic al unor pesticide efectuat de către Amer și Farah (1968) a scos în evidență că aceste substanțe sînt active în inducerea aberațiilor cromozomale care determină alipirea cromozomilor, apariția punților anafazice și a retardatarilor. Ele pot avea efect și asupra fusului de diviziune. Uneori pesticidele, precum produsul „Sevin", au efect poliploidizant.

Erbicidele și insecticidele sînt de asemenea capabile de a induce aberații cromozomale printre care cromozomi lipicioși care se amestecă, punți cromatice, fragmente și micronuclei. Aberațiile cromozomale în meioză au o frecvență mare de la 0,26—66,50% reducîndu-se, în a doua generație, de la aplicarea tratamentului la 0—11,34%. Uneori, aberațiile cromozomale produse de pesticide, erbicide și insecticide, exced pe cele produse de raze X (5.500 r) și etilmetansulfonat (EMS 1000 ppm, 12 h) (Wuu și Grant, 1967). Alexandrina Mihăilescu și V. Stoian (1973), studiind efectul unor agenți poluanți, au remarcat apariția de modificări la nivelul cromozomal și la nivelul diviziunii nucleare. Astfel fluorul determină apariția fenomenelor de picnoză și ci-

tomixie, prin picnotism, cromozomii prezentînd aspect lipicios, vîscos, cu contur disimulat, formînd mase amorfe în diferitele faze ale diviziunii. Se admite că fluorul cu compușii săi are efect depolimerizant asupra ADN-ului. Urmărind influența SO_2, aceste cercetătoare constată apariția aberațiilor cromozomale, și anume cu o frecvență mult mai mare apărînd aberațiile de tip cromatidic, ceea ce le permite să tragă concluzia că agentul poluant are acțiune specifică în faza S sau G_2; SO_2 avînd efecte asemănătoare cu cele ale iradierii cu raze X, adică efect radiomimetic și SO_2 determină, de asemenea, picnotismul cromozomilor și citomixia, asimetria fusului de diviziune, formarea de triade, pentade, hexade în meioză, diviziuni multipolare, întîrzierea diviziunii, lobări ale nucleilor interfazici, cea mai sensibilă fiind metafaza a doua.

S-a constatat că agenții chimici și fizici mutageni afectează chiasmatipia și crossing-overul în funcție de stadiul meiozei în care el acționează.

Dacă radiațiile ionizante acționează în interfaza premeiotică, se micșorează numărul chiasmelor și este alterată spiralizarea cromozomilor, apărînd univalenți. Cînd acționează în pachitenul timpuriu se înregistrează o mărire a frecvenței chiasmelor, ca urmare a acțiuniii nemijlocite a iradierii asupra procesului de crossing-over. Cînd iradierea se aplică în diplotenul tîrziu, se înregistrează de asemenea o creștere a frecvenței chiasmelor, dar de această dată pe seama dereglării procesului de terminalizare a chiasmelor.

Și inhibitorii sintezei acizilor nucleici și proteinelor influențează deopotrivă frecvența chiasmelor și crossing-overul. Sub influența actinomicinei D este limitată conjugarea cromozomilor omologi și este micșorată semnificativ frecvența chiasmelor. Mitomicina C și ciclohexamida, ca și cloramfenicolul, acționînd la începutul profazei I, la Lilium, au dus la mărirea frecvenței chiasmelor dacă au acționat în zigoten. Dar ciclohexamida, acționînd în zigoten-pachiten, a dus la scăderea frecvenței chiasmelor.

Efectul acestor substanțe este de mare însemnătate căci prin el s-a dovedit necesitatea sintezei suplimentare de ADN în zigoten, pentru începerea sinapsisului. S-a demonstrat de asemenea faptul că chiasmele se formează în cadrul mecanismului ruperii-reunirii. S-a arătat că diferiți factori fizici, chimici dar și biologici pot influența desfășurarea meiozei. Schimbările termice afectează meioza în special la plante. De asemenea, virozele pot determina la lupinul galben apariția univalenților, cromozomilor retardatari și punților anafazice. Substanțele nutritive și conținutul de apă din sol pot influența desfășurarea meiozei. Cele mai frecvente dereglări apar în anafaza I. De fapt se pare că sînt și mai ușor de decelat microscopic de-

reglările în această fază sub formă de punți cromatice, cromozomi avansați, cromozomi retardatari, rămași ca univalenți etc. Desfășurarea meiozei este condiționată și de funcționarea normală a țesutului hrănitor al meiocitelor-tapetum.

În desfășurarea anormală a meiozei un rol deosebit de important îl au remanierile cromozomale reprezentate de deleții, translocații, duplicații și inversii. Prin schimb de fragmente de cromozomi între cromozomi neomologi se realizează translocațiile care duc la schimbarea repartizării genelor în grupele de linkaj. Delețiile terminale sau intercalare ce apar în urma fragmentării cromozomului sau cromatidei, duc (în cazul conjugării unor cromozomi ce au suferit asemenea remanieri cromozomale, cu omologii lor normali) la formarea de bivalenți heteromorfi, care pot fi evidențiați în prochiten sau spre sfîrșitul profazei I. Prin deleție spontană sau provocată apar perechi heteromorfice de cromozomi, evidențiate mai ales în pachiten. La heterozigoții structurali apar configurații multivalente. Cînd deleția este intercalară, conjugarea unui asemenea cromozom remaniat cu omologul său normal duce la apariția, la nivelul bivalentului, a unor bucle ce corespund părții din cromozomul remaniat care lipsește prin deleția intercalară, în urma unei duble fragmentări.

Delețiile sînt cu atît mai dăunătoare, cu cît porțiunea din cromozom pierdută este mai mare și cu cît genele pe care le conține o asemenea porțiune sînt de mai mare importanță. De regulă delețiile homozigote sînt letale.

Uneori gameții care cuprind cromozomi cu asemenea remanieri cromozomale pot fi viabili și fertili.

Prin duplicație se dublează sau se mărește de cîteva ori un anumit număr de gene plasate pe cromozom. Cromozomii cu asemenea remanieri prezintă dereglări în conjugare și în desfășurarea fenomenului de crossing-over. Duplicația poate fi în tandem, directă, inversă, homo și heterozigotă. Conjugarea cromozomilor normali cu omologii lor remaniați prin duplicație, se poate evidenția prin apariția buclelor caracteristice. Duplicația este mai puțin dăunătoare decît deleția. Formarea chiasmelor în cazul duplicației homozigote este un proces foarte complex. Apare o concurență în realizarea conjugării între porțiunile asemănătoare ale cromozomilor omologi duplicați cu consecințe mari asupra separării anafazice, care, de regulă, este dereglată. Apar punți anafazice și fragmente de cromozomi, care duc la formarea de gameți anormali din punct de vedere genetic și funcțional.

Inversiile terminale sau intercalare apar în urma fragmentării cromozomilor sau cromatidelor într-un punct (inversia terminală)

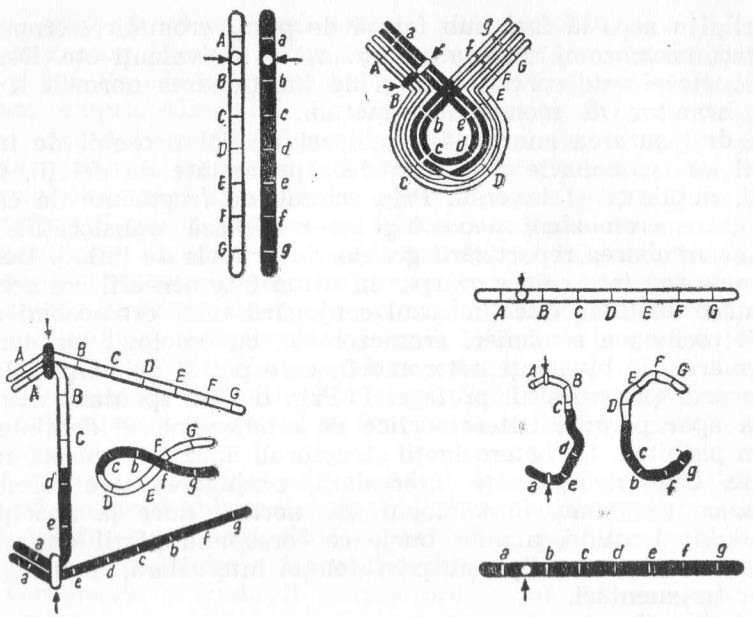


Fig. 127 — *Diagrama prin care se arată cum crossing-over-ul meiotic, la un cromozom heterozigot, pentru o inversie paracentrică, poate duce la eliminarea cromatidelor ce conţin gene recombinate* (după Stebbins, 1971).

sau două puncte (inversia intercalară) urmată de răsucirea cu 180° şi cu realipirea fragmentului de cromozom. Inversiile acentrice (asimetrice sau paracentrice) (Fig. 127), nu includ regiunea centromerică, pe cînd cele eucentrice (simetrice sau pericentrice) afectează regiunea centromerului. În cazul inversiilor acentrice, morfologia cromozomului nu se schimbă. Inversiile pericentrice afectează morfologia cromozomului, un cromozom acrocentric putînd bunăoară să devină metacentric. Multe inversii au efect letal, mai ales în starea homozigotă, dar uneori şi în stare heterozigotă. În urma inversiilor apar efecte genetice care afectează crossing-overul (Fig. 128).

În urma inversiilor, apar la nivelul cromozomilor împerecheaţi, în cadrul fenomenelor sinaptice din profaza I, bucle caracteristice, corespunzătoare regiunilor în care prin inversie s-a produs o inversare a ordinii genelor. În anafază se formează punţi de inversie şi fragmente acentrice sau cromatide anormale, acentrice sau dicentrice. De obicei, fragmentele acentrice şi punţile nu se includ în nucleii telofazici (Fig. 127). În cazul inversiei pericentrice se for-

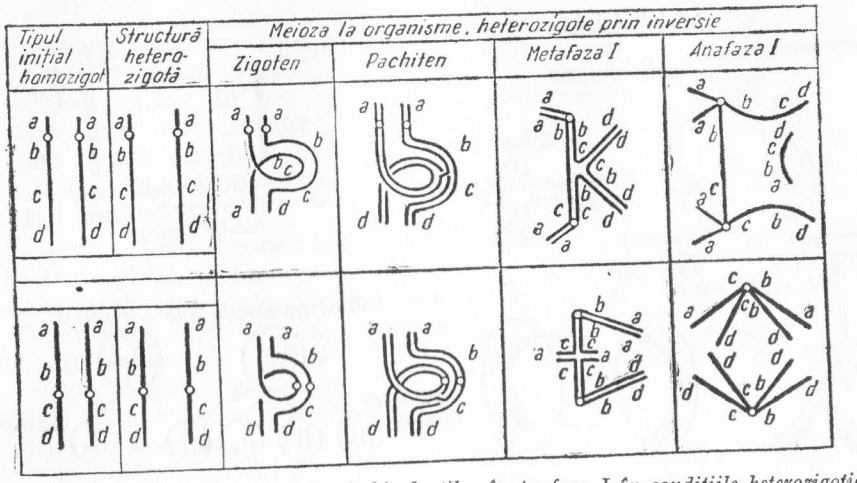


Fig. 128 — *Configuraţiile posibile ale bivalenţilor în profaza I în condiţiile heterozigoţiei prin inversie.* Formarea punţilor şi fragmentelor în anafaza I (după Lewis şi John, 1963)

mează cromatide cu structură genetică nouă. În cazul împerecherii cromozomilor ce prezintă inversii heterozigote apar configuraţii caracteristice de buclă (Fig. 129, 130). Schimbarea configuraţiei bi-

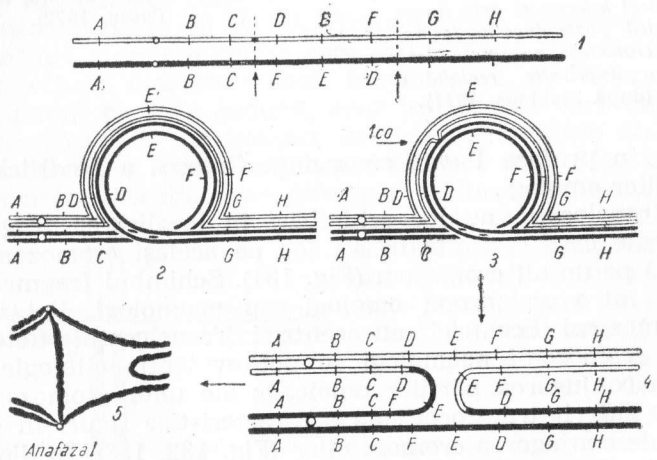


Fig. 129 — *Desfăşurarea meiozei într-un caz de inversie heterozigotă. 1* — reprezentarea a doi cromozomi omologi; *2* — conjugarea cromozomilor omologi; *3* — crossing-overul între două cromatide; *4* — consecinţele crossing-overului ; *5* — aspectul cromozomilor în anafaza I (după P. Petit şi G. Prévost, 1969) CO — crossing-over.

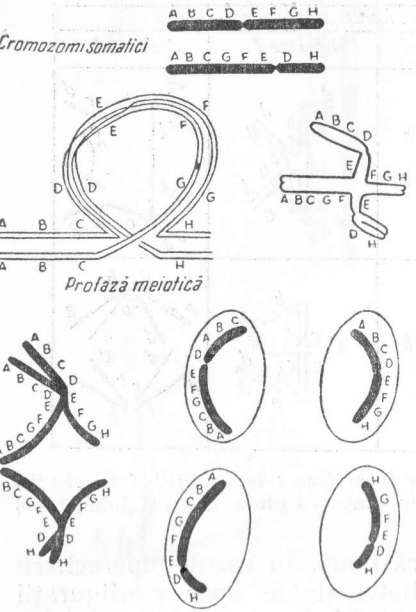


Fig. 130 — *Diagrama prin care se arată cum crossing-overul, desfășurat într-un bivalent heterozigot prin inversie pericentrică, poate duce la formarea a două cromatide anormale, una prezentînd o duplicație, cealaltă o deficiență* (după Stebbins, 1971).

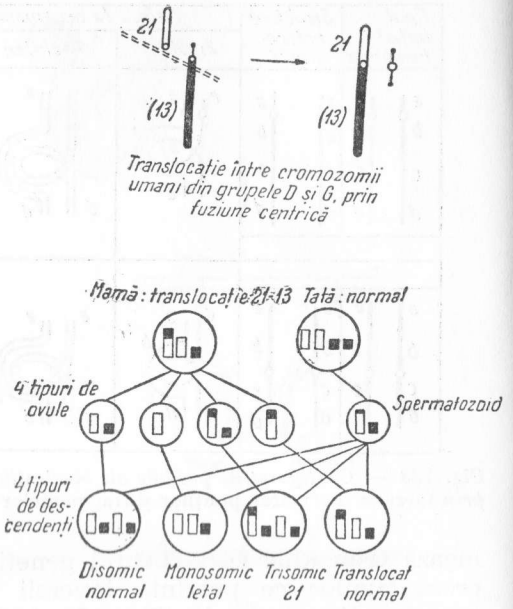


Fig. 131 — *Consecința translocației dintre cromozomii perechilor 21—13, la om* (după Patau, 1972).

valenților în profaza I este consecința firească a modificării localizării locilor omologi.

Prin translocații, au loc schimbări în localizarea fragmentelor cromozomale care se mută în alt loc pe același cromozom sau se localizează pe un alt cromozom (Fig. 131). Schimbul fragmentelor se realizează între cromozomi omologi sau neomologi. Pot să apară astfel cromozomi dicentrici sau acentrici. Translocațiile heterozigote între doi cromozomi neomologi se pot evidenția citologic, relativ ușor. Prin conjugarea părților omoloage ale unor cromozomi omologi ce au suferit translocații apar caracteristice figuri în cruce în profaza I, la conjugarea cromozomilor (Fig. 132, 133). În diachineză, prin terminalizarea chiasmelor, apar inele de translocație caracteristice. Cînd în diachineză apare un inel din patru cromozomi, se poate aprecia cu certitudine că este vorba de un fenomen de heterozigoție apărută prin translocație reciprocă.

În urma acestor remanieri cromozomale, repartiția cromozomilor în nuclei haploizi este neechilibrată, din care cauză viabilitatea și fertilitatea gameților este profund afectată.

Roberts (1972) constată că la Drosophila melanogaster diferențele regionale dintre cromozomi sînt evidențiate prin faptul că sinapsisul începe distal, dar nu la nivelul telomerelor. Aceste diferențe se bazează pe deosebiri intrinseci, în afinitatea sinaptică a brațelor cromozomale. Translocațiile pot fi implicate în apariția acestor diferențe regionale. Ele pot fi represori puternici ai împerecherii, micșorînd recombinarea în interesul brațului cromozomal de la 40 la 1%. Translocațiile realizează o nouă microarhitectură a cromozomului care influențează răspunsul brațului la împerechere mai mult decît lungimea sa. La Oryza sativa, în urma iradierii cu raze gamma, apar translocații care determină asocierea cromozomilor cu formare de lanțuri sau inele din 4 cromozomi, iar uneori 6, 7 și 9 cromozomi (Yesoda Raj 1972). La heterozigoții prin translocație apar diferențe în lungimea brațelor cromozomale dînd perechi heteromorfice (Zen, 1961). La asemenea heterozigoți prin translocație pot să apară pe lîngă bivalenți și univalenți (Noda, 1961), precum și alte variate asociații sub formă de inele și lanțuri (Thomas, 1961). Apariția buclelor în pachiten, la cromozomii împerecheați, este o dovadă a translocației între cromozomul 1 și 6, la Neurospora crassa. În cazul translocațiilor

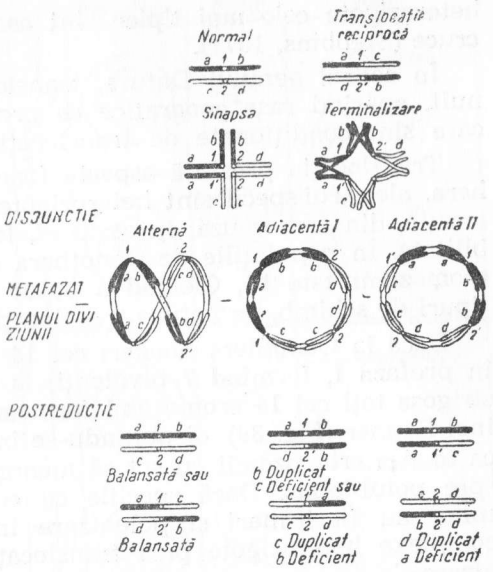


Fig. 132 — *Modele de segregare a cromozomilor translocați* (după A. Whiting, R. Smith și von Borstel, 1968).

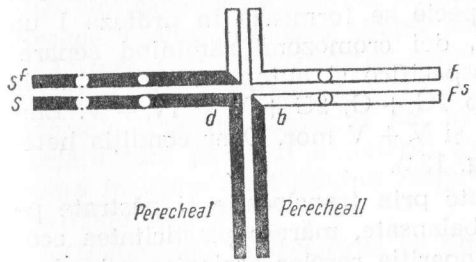


Fig. 133 — *Diagrama împerecherii în pachiten a patru cromozomi la un heterozigot prin translocație reciprocă* (după S. Zen, 1961).

heterozigote cele mai tipice sînt asocierile meiotice sub formă de cruce (Stebbins, 1971).

În cadrul genului Datura, translocaţia este un eveniment obişnuit, apărînd rase geografice ce prezintă particularităţi cariotipice care sînt condiţionate de translocaţii între cromozomii neomologi.

Translocaţia prezintă aspecte foarte interesante la genul Oenothera, ale cărui specii sînt heterozigote prin complexe genice de translocaţie, din care cauză, în cazul ei, legile mendeliene nu au aplicabilitate. În populaţiile de Oenothera sp., al cărui număr diploid de cromozomi este 14, Cleland a putut să constate existenţa a 91 de tipuri de schimb, de natura translocaţiei heterozigote.

Dacă la Oenothera hookeri cei 14 cromozomi se conjugă normal în profaza I, formînd 7 bivalenţi, la O. muricata, O. biennis şi O. strigosa toţi cei 14 cromozomi formează în profraza I un inel numit inel Renner (Fig. 39), dispunîndu-se în metafaza I în zig-zag, pentru ca în A_I, cromozomii cu soţ să meargă spre un pol iar cei fără soţ spre polul opus. Dacă speciile cu conjugare normală a cromozomilor au flori mari şi polenizare încrucişată, cele care prezintă complexe heterozigote prin translocaţie au flori mici şi autopolenizare.

La O. biennis se formează două tipuri de grăuncioare de polen şi ovule: cu complexe rubens (R) şi cu complexe albicans (A). Sînt funcţionale doar grăuncioarele de polen cu complex rubens şi ovulele cu complex albicans, cele care prezintă alte complexe degenerează. În zigot este posibilă doar o singură combinaţie de tip rubens + albicans. Combinaţiile rubens + rubens sau albicans + albicans nu sînt posibile în zigot. Este vorba aici de un fenomen de heterogamie prin care gameţii au constituţie genetică opusă.

La O. lamarckiana, cu complexe gaudens (G) şi velans (V), ovulele şi grăuncioarele de polen sînt funcţionale numai cînd conţin ambele complexe. La această specie se formează în profaza I un inel Renner din 12 cromozomi, doi cromozomi rămînînd separat împerecheaţi. Încrucişările intraspecifice şi autopolenizarea duc la realizarea unor combinaţii de tip 1G + G, 2G + V şi IV + V. Embrionii homozigoţi de tip G + G şi V + V mor. Doar condiţia heterozigotă (G + V) este viabilă (Fig. 134).

Complexe heterozigote, apărute prin translocaţie şi păstrate pe calea heterogamiei şi letalităţii balansate, măresc plasticitatea ecologică a speciei şi condiţionează apariţia raselor ecologice prin dezorganizarea grupelor de înlănţuire existente şi reorganizarea altor grupe de înlănţuire.

Cromozomii dicentrici (Fig. 121) prezintă un comportament specific în meioză, migrarea lor spre poli depinzînd de faptul dacă ambii centromeri sînt legaţi de unul sau de ambii poli ai fusului. Cromozomii dicentrici pot să apară în urma iradierii sau acţiunii substanţelor chimice mutagene. În meioză, apare o concurenţă între cei doi centromeri pentru conectarea la poli. În anafaza I, deşi partea intercentromerică devine subţire ca urmare a legăturii şi atragerii celor doi centromeri la poli opuşi, întreg cromozomul dicentric poate migra la un singur pol, funcţional fiind doar unul dintre centromeri.

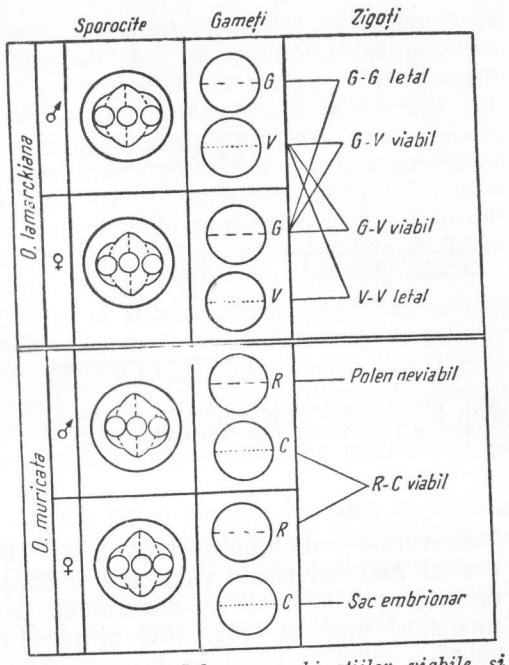


Fig. 134 — *Schema combinaţiilor viabile şi neviabile la Oenothera (efect Renner)* (după Swanson ş.a., 1969. G. V. R. C., complexe de translocaţie (gaudens. velans, rubens, curvans).

Datorită iradierii apar cromozomii inelari (pot să apară şi spontan) în urma a două fragmentări cu pierderea telomerelor şi unirea a doi cromozomi lipsiţi de telomere.

Aceşti cromozomi inelari sînt nestabili în meioză, fiind eliminaţi. În mitoză ei pot fi stabili, pot cliva în două inele cromozomale care sînt capabile să migreze normal spre poli. Dar cel mai adesea ei formează punţi anafazice simple sau duble. Cînd cromozomii inelari se formează din metacentrici apar punţi duble sau punţi obişnuite, crossing-overul putînd să apară cu aceeaşi frecvenţă ca în cazurile normale. Punţile anafazice pot să reflecte schimbul de cromatide inelare care poate fi unilateral (nereciproc). Punţile duble pot să apară în urma unui schimb reciproc între o cromatidă soră şi cromatidele inelare.

Cromozomii metacentrici cu două braţe identice s-au numit izocromozomi şi apar ca rezultat al clivării anormale (misdivision) a cromozomului în cromatide prin clivarea centromerului după planul

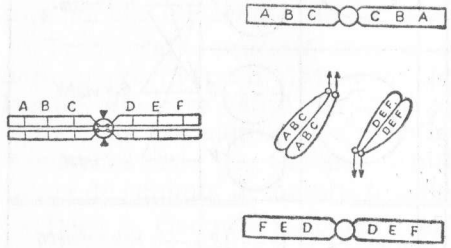


Fig. 135 — *Diviziunea anormală a centromerilor* (după Riger şi Michaelis, 1967).

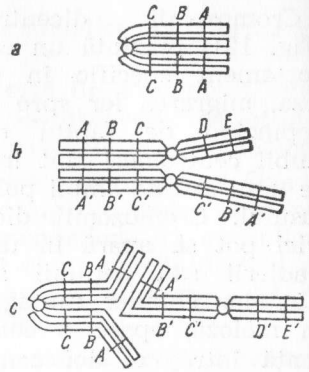


Fig. 136 — *Tipurile de conjugare a izocromozomilor* (după Sen, 1952). *a* — internă; *b* — fraternă; *c* — combinată.

transversal nu longitudinal (Fig. 135). Avînd braţe identice, în cursul meiozei poate să apară o conjugare internă (în sine) sau o conjugare a acestor cromozomi cu braţul corespunzător de la cromozomul omolog (Fig. 136) şi prezintă o separare anafazică aberantă.

3. INFLUENŢA FACTORILOR BIOLOGICI

Este interesant de remarcat că nu numai agenţii fizici sau chimici provoacă modificări structurale, mutaţii, la nivel cromozomal. Şi agenţii biologici au efect dăunător asupra cromozomilor, determinînd modificări structurale asupra nucleului şi cromozomilor ca şi asupra diviziunii celulare. Încă de la începutul secolului XX, Dangeard şi alţi cercetători au remarcat prezenţa unor paraziţi endonucleari din grupul Chitridiales (ciuperci), la Euglena, care determină modificări majore ale formei, structurii şi comportamentului nucleului şi cromozomilor în diviziune. Paraziţii, ca Sphaerita sp., Nucleophaga, determină hipertrofia nucleului şi a cromozomilor ducînd la dispersarea acestora în numeroase fragmente. Sînt şi bacterii parazite la nivelul nucleului care determină profunde modificări în desfăşurarea diviziunii nucleare şi comportamentului cromozomilor în diviziune. Astfel, la Euglena denses a fost evidenţiată o asemenea bacterie parazită intranuclear care a fost numită Caryococcus hyper-

trophicus. Un grup mare de microorganisme, cunoscut sub numele de microplasme, determină profunde alterări ale materialului genetic. Şi unele sporozoare din genul Caryophagus, au acelaşi efect asupra diviziunii nucleare, împiedicînd uneori desfăşurarea diviziunii aşa cum se întîmplă la Amoeba sp., parazitată de Nucleophaga amoebae.

Cercetînd dezvoltarea celulelor de Sciara ocellaris, s-a constatat că sub influenţa unei microsporidii are loc creşterea volumului cromozomal, apariţia fenomenelor de politenie şi modificări structurale notabile la nivelul cromonemelor. Uneori apar şi cazuri de poliploidie sau de transformare malignă.

Cercetările lui Brito Da Cunha şi colaboratorii (1968) au arătat că la un dipter, sciarid, Trichosia sp., apar modificări cromozomale induse de o gregarină parazită. În urma acţiunii acestui agent biologic, cromozomii celulelor gazdă cresc exagerat, atingînd dimensiuni anormale, prezentînd constricţii suplimentare. Ulterior, apar fragmente cromozomale prin disocierea cromozomilor politeni. Celulele devin poliploide.

Studiul citogenetic, efectuat de către Sajiro Makino şi Takao Aya (1968), asupra leucocitelor în culturi, a arătat că există un anumit raport între dereglările (aberaţiile) cromozomale şi infecţia virală (Fig. 137). În oncogeneză apar numeroase anomalii cromozomale. Chiar şi în urma vaccinării pot apare anomalii cromozomale, printre care rupturi cromatidice şi cromozomale, translocaţii reciproce. Apar, de asemenea, schimburi intercromatidice, dicentrici şi inele, la bolnavii de herpes, hepatită, meningită aseptică etc.

Natura virotică a cancerului este după mulţi cercetători o certitudine. Celula canceroasă scapă de sub controlul normal al diviziunii celulare şi se divide haotic, dînd clone celulare anormale. Se consideră că substanţele chimice, radiaţiile, deschid doar calea virusului.

În mod normal, celulele organismului sînt apărate de integrarea genomului lor cu virusul care preexistă în mediul intern, această protecţie fiind situată, probabil, în

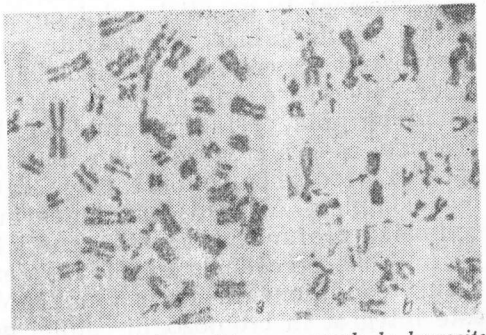


Fig. 137 — *Anomalii cromozomale la leucocite în cultură, la bolnavi de hepatită epidemică.* *a* — placă metafazică cu fragmentări de tip cromatidic şi cu cromozomi ce prezintă interschimb cromatidic (indicat prin săgeţi); *b* — zece cromozomi cu fragmentări de tip cromatidic (săgeţi); *c* — un cromozom dicentric (după S. Makino şi T. Aya, 1968).

afara limitelor reacţiilor imunologice. Protecţia poate fi însă anihilată de numeroşi factori, precum cancerigenii chimici, radiaţiile ionizante şi virusurile infecţioase, dînd posibilitatea desfăşurării procesului neoplazic provocat de virusuri preexistente în organism şi care pînă acum nu au desfăşurat activitate patogenă (L. A. Zilber, 1962).

Cromozomii din celulele canceroase prezintă un număr foarte mare de anomalii cromozomale care pot constitui cauza primară a cancerogenezei sau pot fi urmarea acesteia. În cazuri de leucemie s-a constatat că unul din cromozomii cei mai mici ai complementului uman, şi anume un cromozom din grupa G, pierde un fragment din braţul mare. Interesant că această anomalie cromozomală (deleţie) nu se poate decela decît la cromozomii din celulele măduvii roşii hematopoetice, ceea ce constituie un argument pentru ipoteza că ea stă la baza generării leucemiei. Mai mult, această anomalie cromozomală apare mai înainte de a se manifesta boala, dar ea neapărînd niciodată la oamenii sănătoşi. Cauza anomaliei este încă incertă. Se admite că un virus sau un alt factor mai puţin specific stă la baza ei. Recent, s-a evidenţiat în cazuri de leucemie, în afara deleţiei braţului lung al unui cromozom din perechea 21, numit cromozom „Ph" (Phyladelphia), şi o translocaţie între unul dintre cromozomii perechi 9 şi unul dintre cromozomii perechi 21. Şi în alte forme de cancer, anomaliile cromozomale preced debutul bolii. Trisomia perechii 21 de cromozomi determină, de asemenea, predispoziţie la oncogeneză.

Experienţele geneticianului englez Harris, prin care a reuşit să obţină celule hibride din celule canceroase şi celule normale au demonstrat că celulele normale exercită un efect inhibitor asupra celor canceroase anihilîndu-le efectul malignizant. Dacă radiaţiile pot determina desfacerea dublului helix de ADN şi fragmentarea acestuia, ca şi a cromozomilor, determinînd tulburări grave în desfăşurarea proceselor celulare proliferative, virusurile acţionează mult mai complex, ADN-ul viral integrîndu-se ADN-ului celulei gazdă, tulburînd profund informaţia genetică a acesteia.

În 1969, cercetările lui H. M. Temin au arătat că unele rebovirusuri condiţionează sinteza unui ADN în celula gazdă care apoi este integrat în cromozomii celulei gazdă, făcînd ca aceasta să evolueze spre malignizare. Rezultă că ARN viral poate funcţiona ca matriţă pentru ADN avînd loc un transfer de informaţie genetică nu de la ADN la ARN, aşa cum a stabilit dogma centrală a geneticii, ci invers, de la ARN la ADN.

Este interesant de remarcat că atît în celulele normale cît şi în cele anormale, în curs de proliferare, apar modificări nucleare şi

cromozomale identice, deosebirea constînd însă în frecvenţa apariţiei lor şi în evoluţia lor ulterioară. Adesea, în tumori benigne, indicele de activitate mitotică este foarte scăzut, iar frecvenţa anafazelor modificate este cu mult mai mică decît în celulele normale, cu proliferare slabă.

În fibroame, frecvenţa endomitozelor este foarte ridicată, ducînd la naşterea de nuclei hipertrofici din fibroblaşti.

În cazul stadiilor precanceroase, preautonome, indicele mitotic este foarte ridicat, de peste 25 ori mai mare decît în tumori benigne sau în ţesuturi normale cu proliferare slabă. Frecvenţa anomaliilor cromozomale creşte de la 0,5% cît s-a înregistrat în cazul fibroamelor, la 28,6%. Apar de asemenea restructurări genomice şi anomalii ale diviziunii reprezentate prin anafaze tri şi multipolare.

In tumorile maligne numărul mitozelor este foarte mare. Dacă în ţesuturile normale şi în fibroame frecvenţa mitozelor este de 1 : 10. 000 de celule, în tumorile maligne, frecvenţa acestora este de 1 : 100 de celule. Apar de asemenea cu o frecvenţă mult sporită, tulburări genomice şi cromozomale. Apar metafaze cu cromozomi la nivelul polilor, cromozomi izolaţi ai metafazei, dispuşi în apropierea centriolilor, metafaze şi anafaze tripolare. Se remarcă, de asemenea, conjugarea somatică a cromozomilor. Apar anafaze cu punţi şi cu fragmente în proporţie de 60—73% din totalul anafazelor, iar uneori asemenea anomalii ating 90%. Există o specificitate de ţesut a acestor anomalii. De exemplu, în cazul cancerului uterin şi în sarcoame, sînt foarte frecvente metafazele cu cromozomii la nivelul polilor. În metastaze, cancer murin transmisibil, sarcom Rous, numărul reorganizărilor cromozomale şi genomice este mic.

Din cauza unei diviziuni suplimentare a centriolilor se formează noi fusuri şi noi poli de atracţie pentru cromozomii ce se dezintegrează în metafază în celula canceroasă. Apar în felul acesta mitoze uni, tri, tetra şi multipolare. Din cauza punţilor multiple, diviziunea este îngreuiată apărînd celule poliploide.

În cazul cromozomilor situaţi la nivelul polilor în faza de metafază, majoritatea cromozomilor rămîne la ecuator, netrecînd în faza de anafază. Se formează un nucleu hiperhipoploidic (clivarea cromozomilor nu este împiedicată) voluminos şi doi nuclei mici de aspectul unor cariozomi independenţi (corpusculi nucleari).

Ohno, Kaplan şi Word au remarcat că, în urma conjugării somatice a cromozomilor, pot apare celule cu număr haploid de cromozomi.

Pot să apară şi fenomene de conjugare somatică a cromozomilor, în urma cărora rezultă celule cu număr haploid de cromozomi.

Se mai remarcă diviziuni inegale — repartizare neechilibrată a cromozomilor spre poli — din cauză că sînt afectate funcţiile aparatului mitotic. Din cauza dereglării mitozei iau naştere celule poliploide, gigante, cu cîteva sute de cromozomi (omul are în complementul normal 46 de cromozomi) sau celule diplohiperhipoploide la care există o serie diploidă de cromozomi, dintre care unii se află în număr mai mare, iar alţii în număr mai mic. Modificările cromozomale apar în urma unor translocaţii reciproce în stadii ce preced anafaza. Translocaţiile ce apar în urma procesului de reproducere-mutaţie se realizează atît între cromozomi şi cromatide neomoloage cît şi între cromatide surori. În acest din urmă caz se realizează scindarea transversală inegală a cromozomilor („miss-division"). De obicei punţile sînt reprezentate de cromozomi dicentrici (cu doi centromeri) care sînt atraşi spre poli opuşi, rupîndu-se inegal şi repartizîndu-se spre poli fragmente inegale de cromozomi, lipsite de telomere şi care, reproducîndu-se în următorul ciclu mitotic, se unesc, cap-la-cap, dînd din nou punţi cromozomale. Apar de asemenea cromozomi inelari în urma procesului de „miss-division."

Oricum, aceste profunde remanieri cromozomale modifică în ultimă instanţă genotipul, apărînd o nouă ordine în succesiunea codonilor, ducînd la amplificarea unor funcţii (proliferarea) sau la diminuarea altora. Apariţia celulelor cu mai mulţi nuclei sau a celulelor în nucleii cărora apar cromozomi remaniaţi determină prezenţa fenomenului de heterociclie, care alterează profund funcţiunea celulei şi determină caracteristica sa malignizantă.

Alte cercetări au stabilit că există o corelaţie directă între ritmul de proliferare şi frecvenţa variabilităţii cromozomale şi genomice. Cu cît indicele mitotic este mai mare, cu atît indicele de variabilitate cromozomală şi genomică a ţesutului este mai ridicat. Dacă în decursul filogeniei, aberaţiile cromozomale, precum inversiile, au jucat un rol însemnat în divergenţa speciilor, alături de translocaţii, duplicaţii, poliploidie, în ontogenie asemenea remanieri cromozomale au un rol de prim ordin, ducînd în condiţii normale la apariţia numeroaselor tipuri celulare (la om, după datele lui Zavarzin şi colaboratorii, sînt 136 asemenea tipuri: celule bi şi multinucleate din ficat, celulele lui Descemet, din epitetul cornean, celulele multinucleate, din mezoteliul mezenterului, celulele gigante multinucleate, din epiteliul de tranziţie al vezicii urinare, policariocitele din măduva osoasă, monocitele sanguine etc.) legate de procesele de creştere, de diferenţiere, de regenerare tisulară şi imunologice, iar, în condiţii anormale, la apariţia celulelor canceroase. Se consideră că sistemul neuro-endocrin joacă un rol important în controlul proliferării celulare. Cînd, datorită diverselor cauze, celula scapă de sub acest control apare malignizarea. Dacă în condiţii normale există mecanisme de eliminare a formelor celulare nocive, aberanţe, ce nu folosesc funcţionării organismului în condiţii de proliferare malignă lipseşte un asemenea mecanism. Unii loci, responsabili de controlul proliferării celulare, sînt duplicaţi, ducînd la mărirea frecvenţei diviziunii celulare şi la apariţia celulelor diplohiperhipoploide ce caracterizează ţesutul tumoral, în care se remarcă prezenţa unui număr mare de linii celulare prin a căror proliferare va duce la epuizarea organismului. Pe de altă parte se consideră că malignizarea celulei este determinată şi de fenomenul de derepresie a unor gene, sub influenţa unor factori cancerigeni, în urma cărora sînt activate genele care controlează sinteza fermenţilor şi care determină desfăşurarea de diviziuni rapide. În ţesuturile normale aceste gene se află în stare represată.

După cum se vede în mecanismul malignizării celulelor, sînt implicate complicate procese ce ţin de reglarea activităţii genice.

Capitolul XI

REGLAREA DIVIZIUNII CELULARE

Diviziunea celulară este un fenomen deosebit de complex a cărei desfășurare se realizează sub un anumit control fără de care nu s-ar putea concepe stabilitatea relativă a sa. Desfășurarea diviziunii celulare este reglată la nivel genetic și epigenetic. Însăși replicarea cromozomului este reglată genetic la trei nivele: la nivel celular, avînd loc într-o anumită perioadă a ciclului mitotic (perioada S), la nivel intercromozomal (diferiții cromozomi ai complementului cromozomal își replică materialul genetic asincron) și la nivel intracromozomal (diferitele regiuni ale cromozomului se replică asincron). Mai mult, chiar sinteza ADN-ului este un proces supus unor mecanisme fine de reglaj genetic și epigenetic (prin produși celulari specifici).

Cromozomul îndeplinește trei funcții principale, fiind un replicator, în timpul duplicației informației genetice, un transcriptor, prin care informația genetică este pusă la dispoziția sistemului celular pentru sinteze proteice și coordonarea activității sale metabolice, și este un depozitar al informației genetice, secvențialitatea nucleotidelor din macromolecula de ADN reprezentînd codificarea acestei informații genetice.

Activitatea autosintetică a cromozomului caracterizează celulele angajate în proliferare activă, pregătindu-le pentru diviziune.

Activitatea heterosintetică caracterizează cromozomii din celulele ce sintetizează noi molecule, pe cînd activitatea nonsintetică caracterizează celula cu diferențiere completă și cu activitatea metabolică limitată.

Trecerea informației genetice cifrată în secvența de perechi complementare de baze azotate din macromolecula de ADN în secvența de aminoacizi din macromolecula polipeptidică se realizează prin intermediul unităților de codificare (codoni, triplete) în procesul de codificare biochimică a sintezei proteice.

Etapele decodificării informației genetice sînt transcripția și translația acesteia. Transcripția se realizează de către ARN-m. Translația se realizează prin atașarea acestui ARN-m de ribozomi

și trecerea secvenței de baze azotate transcrise într-o secvență specifică de aminoacizi.

În cadrul procesului de diviziune celulară este trecută informația genetică de la o generație celulară la alta. Sistemul semiconservativ de replicație a ADN-ului pe de o parte și a cromozomului pe de alta, asigură transmiterea cu fidelitate a acestei informații genetice.

Procesele de replicație sînt reglate genetic. De asemenea, sînt reglate și procesele de sinteză proteică pe două căi: inhibiție prin produs final (concentrația anumită a procesului final acționînd asupra primei etape a căii metabolice, blochează sinteza) și represie prin care sînt blocate etapele primare sau secundare ale producerii enzimelor necesare sintezei. Represia este tot un fenomen de feedback, însă mult mai eficient decît inhibiția, scutind sistemul celular de efectuarea unor sinteze nedorite. Dar inhibiția este mai flexibilă și mai rapidă decît represia. Genele structurale sînt angajate în controlul sintezei proteice, genele reglatoare controlează cantitatea de enzime produse, iar genele operatoare, adiacente genelor structurale, controlează inițierea sintezei locale a ARN-m. Produsul genei reglatoare, acționează asupra operatorului și îl face inactiv.

Funcția autocatalitică a genei se realizează în condițiile în care ea își servește sieși drept propriu model, replicația sa fiind mediată enzimatic.

Realizarea funcției autocatalitice și heterocatalitice a genei este reglată genetic, depinzînd de starea materialului cromozomal și anume de starea difuză ce caracterizează cromatina nucleului interfazic, aceasta servind deopotrivă pentru replicație și pentru transcripție.

Inițierea sintezei ADN-ului este determinată de creșterea concentrației dezoxiribonucleotidelor trifosfați, activarea ADN-ului de către ADN-ază și prezența unei anumite cantități de ADN-polimerază. Sinteza dezoxiribonucleotid-trifosfaților este sub influența unor anumiți factori care intervin în reglajul diviziunii. Derepresarea genelor este realizată prin funcționarea unor circuite metabolice reglatoare și prin activarea operonilor celulari.

Studiul mutantelor a scos la iveală existența unor mecanisme genetice de reglare a diviziunii celulare.

Astfel, desinapsia meiotică la genul Colocasia, este un exemplu de reglaj genetic al meiozei. Deși are loc conjugarea normală în pachiten și formarea bivalenților, spre diachineză dispare împerecherea cromozomilor ca rezultat al spiralizării precoce. În anafaza I, cromozomii omologi se distribuie pe bază de hazard, indepen-

dent unii faţă de alţii. Este interesant că deşi sterilitatea polenului depăşeşte 80%, descendenţa vegetativă a acestor plante păstrează caracterul de desinapsie a meiozei. Desinapsia apare ca rezultat al variabilităţii mutagene a genei ce controlează conjugarea omologilor. Schrader S. Hughes (1969) consideră că efectul epistatic asupra formării chiasmelor este determinat poligenic. Genele ce afectează desfăşurarea diviziunii pot afecta şi alte caractere ale organismului. Aşa este cazul la Drosophila simulans, la care mutaţia recesivă „claret" afectează culoarea ochilor deopotrivă cu mersul meiozei, la femele.

Hall (1972) a evidenţiat o genă C (3) G plasată pe cromozomul III, la Drosophila melanogaster. Cînd la femelă, această genă este în stare homozigotă, este eliminată conjugarea cromozomilor omologi sau apare nondisjuncţia cromozomilor în A_I. La porumb şi secară, prin realizarea homozigoţiei genelor asinaptice, în urma autopolenizării, se realizează un asinapsis regulat.

Dereglările meiotice, care apar la formele allopoliploide şi la formele hibride interspecifice, sînt legate de particularităţi genetice.

Un interesant mecanism de reglaj genetic al meiozei este acela pe care l-am întîlnit la grîu, Triticum aestivum, cunoscut ca acţiune a genei „Ph", plasată pe braţul lung al cromozomului V B. Sisteme genetice asemănătoare au fost descrise şi la alte organisme.

Cromozomii 1B, 4B, 2D şi 4D de la Triticum aestivum, condiţionează păstrarea integrităţii cromozomului la centromer. Cînd sînt în doză simplă apare diviziunea anormală a centromerului, ducînd la formarea izocromozomului sau telocentricului ce dereglează mersul meiozei. La Triticale, Müntzing a stabilit că apariţia univalenţilor este rezultatul funcţionării genelor recesive ce controlează meioza.

Semnificaţia cromozomilor B în desfăşurarea diviziunii meiotice s-a tratat la capitolul despre meioză. Cromozomii B, la secară măresc durata ciclului mitotic în special durata fazei S şi G_2, datorită reproducerii întîrziate a acestor cromozomi (care sînt heterocromatici, în general) şi a măririi cantităţii de ADN pe seama lor. Controlul genetic efectuat de cromozomii B este însă mai bine conturat în desfăşurarea meiozei, prezenţa lor influenţînd conjugarea omologilor şi formarea chiasmelor.

În cursul ciclului celular are loc activarea succesivă a genelor ce determină sinteze specifice de ARN-m şi proteine cu rol în influenţarea comportamentului şi distribuţiei cromozomilor în mitoză şi meioză. Astfel s-a constatat că la Lilium şi Trillium, în cursul valurilor mitotice sincrone din microspori, înainte de începerea sintezei ADN-ului, apare brusc, într-un timp scurt, timidinkinaza. Se consideră că timidinkinaza este sintetizată printr-un mecanism de inducţie comparabil cu sinteza fermenţilor adaptativi de la bacterii.

Activarea periodică a unor gene pe parcursul ciclului mitotic este condiţionată de factori ce se află în interiorul cromozomilor. Activitatea genică şi inhibiţia sintezei proteice sînt nemijlocit legate de genom, iar reglarea inactivării fermentului se realizează de către componente extracromozomale.

Împerecherea cromozomilor în meioză este o funcţie a omologiei perfecte a cromozomilor perechi (similitudine structurală, chimică şi funcţională) şi a mediului celular din meiocite. Mediul celular din meiocite poate fi afectat la rîndul său de modificări bruşte ale mediului extern (şocurile termice) sau de gene care controlează numeroase reacţii enzimatice necesare pentru meioză.

Genele ce controlează sinteza enzimelor, implicate în catalizarea reacţiilor de sinteză proteică, acţionează prin intermediul sintezei ARN-m. Sinteza acestui ARN-m, în celulele ce nu proliferează, se desfăşoară continuu. Dacă din anumite motive această sinteză este blocată sau este incompletă, celulele revin la un stadiu în care se desfăşoară sinteza unui alt ARN-m, care va dirija din nou celula spre mitoză.

S-a stabilit că anumite proteine celulare pot represa ADN-ul. S-a scos în evidenţă faptul că în plasma extracelulară a ficatului există unele proteine implicate direct în reglarea proliferării hepatocitelor ficatului în regenerarea după hepatectomie. Scăderea cantităţii acestor proteine specifice după hepatectomie crează posibilitatea ca ADN-ul să se replice, iar celula să intre în mitoză. Acest control al creşterii şi multiplicării celulare are la bază mecanisme de retroinhibiţie, compoziţia mediului de cultură avînd în acest caz un rol determinant. Este vorba de aşanumita retroinhibiţie de mediu. Un fenomen similar se remarcă în cazul cultivării intensive a algelor. La Chlorella s-a pus în evidenţă existenţa unui mecanism biochimic de reglare a numărului de indivizi prin eliminarea în mediu, a unui produs al activităţii metabolice, o ectocrină numită chlorellina, efect descoperit de Pratt, Scutt ş.a. Cînd această ectocrină atinge o anumită concentraţie în mediu, ea are efect nociv asupra propriilor celule ca şi asupra altor celule algale cînd se fac culturi mixte (L. Gavrilă, 1972 a, A. Ionescu şi L. Gavrilă, 1971, Al. Ionescu şi L. Gavrilă, 1972), ducînd la diminuarea numărului de celule. Chlorellina este un complex fotolabil, de scurtă durată. Scăderea concentraţiei sale în mediul de cultură face ca celulele algale să-şi reia activitatea proliferativă. Efecte similare s-au găsit şi la alte complexe ectocrine precum scenedes-

mina din Scenedesmus. Aceste complexe ectocrine au efecte similare colchicinei asupra metabolismului celular (Al. Ionescu și L. Gavrilă, 1972).

Multe fapte evidențiază existența unui control epigenetic al diviziunii celulare. Cercetările lui W. Bullough au scos în evidență existența unor substanțe de tip glicoproteic numite generic *chalone*, care intervin în controlul diviziunii celulare. Ele acționează asupra genelor implicate în mecanismele de control ale diviziunii celulare. Efectul acțiunii acestor substanțe este o funcție a concentrației lor; ele funcționează ca represori ai diviziunii în concentrații mari și ca stimulatori în concentrații mici. Specificitatea acestor chalone este în funcție de țesutul de origine. Se pare că pentru fiecare țesut există o chalonă specifică. Hormonii tiroidieni mențin chalonele în țesuturi la anumite nivele ale concentrației lor. Hormonii tiroidieni, ca de altfel și adrenalina, au influiențe similare chalonelor asupra proliferării celulare. Complexarea acestora cu chalonele determină formarea de complexe foarte eficiente în represia diviziunii celulare.

În țesuturile fiziologic active doar în anumite perioade ale vieții organismului, proliferarea celulară cade sub influența unor hormoni mitogeni, eliberați de către alte țesuturi în afară de cele care suferă proliferarea. Este deci vorba de o heteroreglare tisulară. Țesuturile reproducătoare desfășoară activitatea de proliferare sub influența unor hormoni androgeni și oestrogeni. Acești hormoni acționează asupra genelor responsabile de funcția autoreplicatoare a ADN-ului.

În sistemul hematopoetic s-a evidențiat existența unui factor umoral, ce stimulează producerea de hematii, care s-a numit eritropoetină.

Sinteza acizilor nucleici și a proteinelor nucleare în țesuturile plantelor superioare se află sub control hormonal. Kinetina descrește, pe cînd acidul abscisic crește nivelul nucleazei în țesuturile vegetale. Există de asemenea o strînsă corelație între creșterea indusă hormonal a nucleazei și descreșterea conținutului de ADN și viceversa.

Cercetările lui J. Bonner au evidențiat rolul hormonilor în activitatea genelor aflate în stare de represie. La insecte s-a urmărit efectul unui hormon care intervine în procesul de năpîrlire a larvelor și s-a constatat că acesta acționează direct la nivelul genei, determinînd apariția de noi puffuri pe cromozomii uriași, sintetizîndu-se în momentul acțiunii sale un ARN-mesager care poartă informația necesară sintezei unor fermenți specifici.

Diviziunea celulară, unul dintre cele mai complexe evenimente ale celulei, este supusă deopotrivă influenței unor mecanisme de control genetic și epigenetic. Factorii ereditari și de mediu intervin în controlul desfășurării diviziunii celulare. Cercetările lui Gautheret au evidențiat existența unui paralelism între proliferare și prezența acidului indolilacetic în țesuturile vegetale cultivate în vitro. Dar și citokininele și gibberellinele sînt responsabile pentru proliferarea celulară. De asemenea a fost demonstrat rolul mitogen al mucoproteinelor vegetale de tip fitohemaglutinină.

Capitolul XII

CONCLUZII GENERALE

ORGANIZAREA GENETICĂ ÎN LUMEA VIE

Actualmente, organizarea genetică a organismelor cuprinde trei categorii: Procariota, Eucariota şi Mezocariota.

I. ORGANIZAREA GENETICĂ PROCARIOTĂ

Se întîlneşte la virusuri, ricketsii şi Bedsonia, bacterii adevărate, actinomicete, mixobacterii, spirochete, micoplasmatales, alge albastre (cianoficee — mixoficee) şi probabil Kakabekia.

A. *VIRUSURILE* prezintă un statut particular. Origine evolutivă necunoscută pînă acum. Nu se ştie dacă reprezintă o formă foarte veche şi primitivă de previaţă sau dacă unele particule virale, sînt de origine foarte recentă, fiind segmente „scăpate" din cromozomii procariotelor sau eucariotelor. Fiind paraziţi strict specializaţi, evoluţia lor este paralelă cu a gazdei parazitate. Pot suferi mutaţii. Manifestă interrelaţii în cadrul grupelor morfologice (uniformitatea structurală a adenovirusurilor), grupelor proteice (fapt dovedit serologic) şi acizilor nucleici (dovedit prin experienţe de hibridare). Virusurile pătrund şi se replică în interiorul unor medii foarte specifice la care adaptarea lor este critică. Fiecare virion (nucleocapsidă sau stadiu infecţios) conţine fie ADN fie ARN, şi în mod cu totul excepţional ambele tipuri de acizi nucleici. Obişnuit, miezul de acid nucleic apare ca o macromoleculă liniară, circulară sau superspiralizată care cuprinde un anumit număr de gene. Virusul influenza şi reovirusul au un „genom segmentat de acid ribonucleic" de pînă la 10 segmente separate (Shatkin, A. J., 1971). Cele mai mici virusuri au un genom de numai „6 gene". Virionii conţin puţine enzime metabolice, nu se reproduc prin diviziunea virionului, fiind „nevii" şi complet inactive, cu excepţia perioadei cînd intră, funcţionează şi se replică în interiorul unei anumite celule gazdă. Reovirusurile conţin trei tipuri de proteină dintre care una este polimeraza necesară procesului de replicare. Acidul nucleic viral se poate replica în nucleul celulei gazdă iar proteina virală este sintetizată în citoplasma acesteia. În general, ADN-ul adenovirusurilor se replică în nucleul celulei gazdă pe cînd ARN-ul ribovirusurilor în citoplasma acestora. ADN-ul viral este în mod obişnuit dublu-catenar (dublă helice) rareori monocatenar. ARN-ul viral este liniar şi monocatenar. Se cunosc însă şi ribovirusuri cu ARN dublu-catenar. Acidul nucleic viral nu este asociat cu proteinele bazice histone. Genoforul viral, alcătuit din ARN, replică ARN-ul viral şi transcrie ARN-mesager. Uneori ARN-ul viral transcrie o copie de ADN prin mecanismul numit transcripţie reversă (Temin H. S. Mazutani, 1970) folosind enzima ARN-dependent de ADN-polimeraza. Asemenea virusuri pot rămîne în celula gazdă şi să o transforme genetic, adesea malignizînd-o (Temin, H., 1971).

B. *BACTERIILE* ca şi algele albastre reprezintă tipul caracteristic pentru adevărata structură genetică procariotă care are următoarele particularităţi: prezenţa în celulă a ribozomilor de tip 70 S, lipsa din citoplasmă a aparatului Golgi, a reticulului endoplasmatic, a membranei nucleare şi nucleolului, a mitocondriilor şi plastidelor. Diviziunea celulei nu este de tip mitotic, aşa cum greşit a fost interpretată de Delamater (1951). Nu apare fenomenul de „contracţie cromozomală". Au un genom reprezentat de regulă de un singur genofor (cromozomul bacterian) care este o moleculă nudă de ADN, ale cărei capete se unesc spre a da o moleculă circulară, dublu-catenară de ADN. Genoforul bacterian este ataşat la membrana celulară şi acesta joacă un rol esenţial în separarea genoforilor fii, după replicarea semiconservativă a genoforului parental. ADN-ul bacteriilor ca şi al virusurilor cuprinde secvenţe unice de nucleotide, adică fiecare cistron este reprezentat o singură dată în genofor. Cistronii (genele) ADN-r sînt foarte rari şi sînt reprezentaţi prin 5—6 copii. Cantitatea de ADN variază de la $2{,}6 \times 10^{-6}$ pg la virusul Φ X_{174} pînă la $4.000. 10^{-6}$ pg. la Escherichia coli, comparativ cu a eucariotelor la care cantitatea de ADN variază de la 22.000×10^{-6} pg/celulă, la drojdii, la 58 sau 170-180 pg/celulă la Tradescantia şi Ophioglossum.

Ca şi ADN-ul virusurilor, ADN-ul bacteriilor nu se asociază cu histone cromozomale. Replicaţia şi transcripţia ADN-ului la bacterii pot fi evenimente simultane. Molecula de ADN în genomul procariotelor, începe şi se termină cu aceeaşi secvenţă de baze azotate ceea ce înseamnă că apar unele mici repetiţii de nucleotide în molecula circulară de ADN (Thomas, C. A. Jr., 1971). După cum reiese din imaginile electronmicroscopice, pregătirea pentru diviziune

este marcată de modificarea ADN-plasmei (partea din citoplasmă în care se află ADN-ul = nucleoidul sau procarionul) și separarea ei în două agregate ce conțin material nefibrilar și fibre de ADN, reprezentînd procarionii fii. Fiind lipsit de o membrană separatoare față de citoplasmă, procarionul are formă neregulată. Uneori debutul diviziunii este marcat de concentrarea fibrilelor de ADN la mijlocul nucleoidului, urmată de separarea lor în două grupe fibrilare. Este o situație analogă numai cu așezarea metafazică și respingerea și separarea anafazică a grupelor de cromozomi fii de la eucariote. Separarea genoforilor fii, în lipsa unui fus de diviziune, este dependentă de atașarea genoforilor circulari fii la membrana plasmatică a celulei (Jacob F., S, Brenner, F. Cuzin, 1963) sau de formațiunea membranoasă numită mezozom. Genoforii fii se atașeaza în două puncte separate dar adiacente ale membranei plasmatice. Prin creșterea liniară a acesteia, cei doi genofori fii sînt separați. Diviziunea celulei apare astfel ca o funcție a membranei plasmatice. Prin invaginarea circulară a acestei membrane și a peretului celular după un model diafragmatic, cei doi genofori fii sînt separați în două celule fiice.

Genoforul procariotelor apare ca o formațiune circulară, suport material pentru o singură grupă de gene strîns înlănțuite. Se consideră (Sueoka, N., 1968) că există un fel de condensare a genoforilor fii înainte de a se separa, condensare care însă nu este de natura aceleia a cromozomului eucariotelor.

Genoforul procariotic are proprietatea de a se replica și de a funcționa ca matriță pentru producerea de ARN (transcripție) simultan și în orice moment, în condițiile unei creșteri optimale. Acest lucru se realizează prin inițierea replicării genoforului la nivelul unui punct de replicare, punct care „străbate" apoi genoforul circular, separîndu-l în doi genofori fii, așa fel încît genele, în fața și în spatele lui, funcționează în orice moment. Punctul de origine, punctul terminus ca și punctul de înaintare a procesului de replicare a cromozomului la Bacillus subtilis și Escherichia coli sînt asociate cu membrana celulară. Pot exista și puncte adiționale de atașare a macromoleculei de ADN la membrana celulară. Asocierea funcțională și structurală a genoforului la membrana celulară este demonstrată de alterarea proteinelor specifice de membrană, atunci cînd replicarea ADN-ului este inhibată. Modelul de creștere a membranei (demonstrat prin măsurarea distribuției flagelilor) este dependent de prezența sau absența sintezei replicative concomitente a ADN-ului. Prezența unui punct de atașare a macromoleculei de ADN, pe membrană inhibă formarea unor noi puncte de atașare pe o anumită distanță, noile locuri de atașare putînd să apară

numai după ce a avut loc o anumită creștere a membranei prin sinteză de noi membrane citoplasmatice. S-a stabilit, de fapt că replicarea se desfășoară în ambele direcții față de punctul de origine (Pato, M. L., 1972) și că multe din experiențele interpretate inițial ca indicînd o replicare unidirecțională pot fi puse în acord cu această nouă interpretare a replicării bidirecționale. Genele A—B—C sînt replicate în această ordine după inițierea replicării într-un punct plasat pe cromozomul bacterian înaintea genei A, punct care trece prin A, apoi prin B și în continuare prin C etc. Datele ulterioare privind replicarea bidirecțională sînt de asemenea în concordanță cu existența unui punct de origine a replicării între A și B și a două bifurcații de replicare, una care trece prin A înainte ca a doua să fi trecut prin B și C. Există raporturi precise între replicarea genomului bacterian și diviziunea celulară. Oricare celulă ce și-a completat un ciclu de replicare poate să continue să se dividă chiar în prezența inhibitorilor sintezei ADN-ului, pe cînd inhibiția sintezei ADN-ului, înainte de a se fi completat ciclul de replicare, determină blocarea diviziunii celulare.

În celula bacteriană există mai mulți repliconi (unități de replicare sau plasmide) adiționali principalului replicon-cromozomul bacterian. Așa sînt factorul de sex (F), factorul colicinogenic (col), factorul de rezistență (R) și numeroși profagi deficienți. Dar replicarea fiecărei unități autoreplicative de ADN este reglată de propriul său inițiator. Sușele bacteriene incapabile de a-și iniția replicarea cromozomului datorită unei mutații termosensibile pot fi „ajutate" de prezența plasmidelor și acest fenomen se numește „represie integrativă". În acest caz cromozomul și plasmida sînt integrate într-un singur replicon, și astfel replicarea se desfășoară sub controlul plasmidei. Actualmente se consideră că bacteriile posedă mai mult decît un singur mecanism de replicare și control al ADN-ului circular. De reținut că și bacterofagii, în timpul reproducerii vegetative, prezintă ADN-ul atașat de membrana celulei gazdă, dar nu toate aceste puncte de atașare reprezintă și puncte de sinteză activă a ADN-ului fagic (Siegel&Schaechter, 1973). În acest caz, replicarea ADN-ului dublu catenar are loc pe membrană, pe cînd replicarea ADN-ului monocatenar al virusului Φ X_{174} are loc în citoplasmă. Interesant este faptul că și ansamblarea noilor fagi implică membrana celulei gazdă.

După cum a arătat Cairns (1963) cromozomul de E. coli este circular (inelar). În timpul replicației, porțiunea replicată apare între două bifurcații: una este punctul de creștere (de înaintare) cealtă este considerată a fi fixă, ea fiind punctul de origine a replicației. După Caro și Berg (1968) punctul de origine a replicației este

un locus genetic bine definit, numit replicator. În același timp Nagota și Meselson (1968) au arătat că punctul de origine al replicării este variabil la sușele F⁻ și fix la sușele Hfr fiind identificabil cu locul de integrare a factorului F în cromozomul bacterian. ADN-ul celular bacterian este astfel organizat în unități de replicare (repliconi), repliconi care sînt atașați într-un mod anume la membrana citoplasmatică, loc în care ADN-ul circular se prinde prin complexe enzimatice. Acest loc de atașare joacă un anume rol în reglarea replicației ADN-ului bacterian (Ryter, A. Y. Hirota & F. Jacob, 1968; Jacob F., S. Brenner & F. Cuzin, 1963). Separarea și segregarea copiilor de ADN rezultate în urma replicării se realizează prin creșterea membranei celulare între replicele de ADN. După Clark, D. J. (1968), diviziunea celulară este independentă de inițierea unui nou ciclu de replicare. Diviziunea celulară nu are loc dacă replicarea ADN-ului este inhibată înainte de completarea ciclului de replicare. Ultimele evenimente ale diviziunii celulare se desfășoară însă în absența sintezei ADN-ului. Diviziunea fiziologică a celulei apare între terminarea unui ciclu de replicare a ADN-ului și separarea fizică a celulei. Începerea unui nou ciclu de replicare nu este implicată în angajarea celulei în diviziune, dar există o asociere între sfîrșitul unui ciclu de replicare a ADN-ului și angajarea celulei în diviziune.

Dependența diviziunii celulare de replicarea ADN-ului este sugerată de lipsa producerii de minicelule atunci cînd este blocată sinteza ADN-ului. Compartimentarea celulei are loc înainte de separarea fizică prin formarea unui septum urmată de formarea unui perete transversal puternic unind pereții opuși ai membranei celulare. Sfîrșitul ciclului de replicare apare cu mult înainte de compartimentalizarea celulei, eliminînd posibilitatea unei legături fizice între replicarea ADN-ului și formarea septului.

Modelul general acceptat pentru replicarea cromozomului bacterian a fost sugerat de autografia, prezentată de Cairns (1963), a cromozomului de E. coli aflat în replicare cu un singur punct de creștere în formă de Y, care se deplasează de-a lungul cromozomului circular care își replică simultan ambele brațe ale „Y"-ului, adică ambele catene de ADN. Yoshikawa și Sueoka (1963) au propus un alt model în care catenele nou-sintetizate de ADN sînt covalent legate la capătul cromozomului parental. S-au mai propus și alte modele. În cadrul modelului numit „rolling circle" (cercul rostogolitor) una din cele două catene ale ADN-ului circular este liberă, avînd capetele libere 3' (hidroxil) și 5' (fosforil). Capătul 5' iese din cadrul cercului pe cînd capătul 3' este prelungit printr-o polimerază. La capătul 5' începe replicarea prin așezarea pieselor sau fragmentelor lui Okazaki și sinteza unei noi catene de ADN. ADN-ul nou-replicat, a putut fi marcat selectiv și izolat după denaturare sub forma unor molecule mici de ADN („fragmente născînde"). După alterarea activității polinucleatid-ligazei, aceste fragmente de ADN se acumulează, conversia lor într-o moleculă mare de ADN fiind limitată. Aceste fragmente de ADN sînt produse printr-o sinteză direcțională 5' → 3'. Acestea sînt fragmentele lui Okazaki (Okazaki R., 1974) și existența lor sprijină ideea după care ADN-ul este replicat printr-un mecanism discontinuu care implică sinteză și reunire ulterioară sub acțiunea polinucleotid-ligazi, de fragmente mai scurte de ADN, spre a forma o catenă lungă de ADN. Sînt date potrivit cărora există chiar posibilitatea atașării catenelor scurte de ARN la capătul 5' al fragmentului de ADN născînd, sugerînd faptul că sinteza ARN este implicată în inițierea sintezei acestor mici fragmente de ADN. De asemenea capătul 5' pătrunde în celula receptoare în timpul procesului de conjugare.

Dintre toate modelele propuse privind replicarea cromozomului bacterian, modelul lui Cairns (1963) este mult mai acceptabil. S-a constatat că atunci cînd durata unei generații celulare este mai mică decît timpul de replicare a cromozomului bacterian, noi bifurcații de replicare apar înainte ca bifurcația anterioară să fi parcurs întregul cromozom. Noile bifurcații apar pe ambele brațe ale cromozomului (pe cromozomii fii în formare), modelul de inițiere a noilor valuri de replicare fiind conform cu modelul propus de Cairns, și nu cu alte modele cum ar fi acela al „rolling-circle" care presupune plasarea asimetrică a punctelor de creștere, adică punctele de creștere apar doar pe unul dintre cele două brațe ale cromozomului bacterian în replicare. Inițierea sintezei ADN-ului este cuplată cu diviziunea celulară și necesită sinteză de proteine și producere de energie (R. E. Moses, 1974). Actualmente se consideră că sinteza ARN poate juca un rol esențial în întreținerea sintezei ADN-ului. Replicarea ADN-ului bacterian este un proces complex care presupune un strict reglaj genetic, bacteriile putînd avea mai multe mecanisme de replicare și control al sintezei ADN-ului, acestea fiind condiționate de particularitățile repliconului și de condițiile specifice de mediu.

II. ORGANIZAREA GENETICĂ EUCARIOTĂ

Eucariotele sînt organisme cu structură celulară tipică. Prezintă ribozomi de tip 80 S, aparat Golgi, mitocondrii și reticul endoplasmatic. Materialul genetic este organizat la nivelul unui nucleu care

prezintă unul sau mai mulţi nucleoli — implicaţi în sinteza ARN-r. Nucleul este delimitat de o membrană nucleară. În timpul diviziunii materialul genetic nuclear se organizează la nivelul unor organite specifice numite cromozomi. Genomul eucariotelor constă întotdeauna din cel puţin doi genofori (cromozomi). La nivelul cromozomilor, ADN-ul este asociat cu proteine bazice, histone, formînd complexe macromoleculare nucleohistonice. În perioada dintre două diviziuni nucleare succesive, cromozomii (cu excepţia unor alge precum euglenoficeele, sau a unor ciuperci) se află în stadiu difuz, stare în care ei îşi pierd individualitatea morfologică dar în care se desfăşoară activitatea genetică de reduplicare a macromoleculei de ADN şi de transcripţie a informaţiei genetice, prin sinteza variatelor tipuri de ARN. În acest stadiu „difuz", materialul genetic al cromozomilor este reprezentat de macromoleculele de ADN dublu-catenare şi spiralate avînd un diametru de 25 Å fiind asociate cu proteine bazice dînd fibrile nucleohistonice al căror diametru este de 100, 250 sau 300 Å. Atît în nucleul interfazic cît şi în cromozomul metafazic cromatina este organizată sub forma acestor fibre nucleohistonice de 250—300 Å care pot rezulta din cutarea sau spiralizarea unor fibre mai fine, avînd aproximativ dimensiunile moleculei nucleo-histonice (Gall, J. G., 1966). Continuitatea longitudinală a cromozomului eucariotelor este dependentă de integritatea macromoleculei de ADN de la nivelul său.

Spre deosebire de procariote, materialul genetic al eucariotelor se diferenţiază în eucromatină şi heterocromatină, două stări funcţionale deosebite cu mari implicaţii în citodiferenţierea eucariotelor. Condiţia interfazică a nucleoproteinelor eucariotelor formează *genonema* sau *cromonema,* care nu este altceva decît molecula permanentă (atît în nucleul interfazic cît şi în cromozomi) şi continuă de ADN a cromozomului eucariotic. Cromozomul anafazic (cromatida) poate fi alcătuit din două asemenea fibrile (cromonemata) reciproc încolăcite. Existenţa genonemei (cromonemei) cromozomului eucariotic explică continuitatea materialului genetic de la o diviziune la alta, de la interfază la diviziune, de la o generaţie celulară la alta, asigurînd astfel constanţa grupelor de înlănţuire a genelor (grupelor de linkage) genonema (cromonema) cromozomului eucariotelor fiind suportul material pentru secvenţa liniară de gene care se transmite astfel intactă, în condiţii normale, de-a lungul generaţiilor celulare.

Cromozomul eucariotelor. De la prima semnalare a cromozomilor de către Hoffmeister, la 1848, au trecut mai bine de 125 ani. Deşi a fost supus unui intens studiu, cunoaşterea noastră asupra cromozomilor este încă fragmentară, incompletă. Cîteva date în înţelegerea rolului acestor structuri nucleare sînt necesare. La 1882, Flemming şi Strasburger descoperă fenomenul clivării longitudinale a cromozomului cu profunde implicaţii în fenomenul ereditar. În acelaşi an, Van Beneden constată că jumătăţile de cromozomi rezultate din clivare (cromozomii fii) se separă în nuclei fii diferiţi. Tot el, la 1883, descoperă fenomenul de reducere a numărului de cromozomi la formarea gameţilor. În 1885, Hertwig şi, în 1887, Strasburger observă unirea, în procesul de reproducere sexuală, a doi nuclei cu număr de cromozomi redus la jumătate, nuclei care aparţin la gameţi de sex opus. În 1909, Boveri demonstrează continuitatea fizică şi genetică a cromozomilor de-a lungul generaţiilor celulare, bazat pe descoperirea, în 1908, făcută de către Bonnevie (confirmată în 1911 de către Nejdovsky) a cromonemei, ca esenţială caracteristică structurală a cromozomului. În 1902, Boveri afirmă diferenţierea calitativă a cromozomilor unui complement cromozomal fapt strălucit confirmat de către Blakeslee, prin studiul aneuploizilor de Datura. Toate aceste cuceriri în înţelegerea structurii şi funcţiei cromozomului, alături de ideea lui Roux, emisă încă la 1883, după care unităţile ereditare (genele) prezintă un aranjament liniar pe cromozomi şi alături de constatarea extraordinarei suprapuneri a comportamentului cromozomilor în diviziune şi a factorilor ereditari mendelieni în ereditate au fost strălucit îmbinate într-o sinteză unică, reprezentată de teoria cromozomală a ereditaţii, elaborată în a doua decadă a secolului nostru de către Th. H. Morgan şi şcoala sa.

Cromozomul eucariotelor este un organit cu morfologia dinamică determinată de ciclul de condensare şi spiralizare a cromonemei, ciclu care nu se întîlneşte la procariote. Forma cromozomului metafazic este determinată de localizarea unei regiuni specializate a cromozomului — centromerul (cinetochorul) — care structural şi funcţional se distinge de restul braţului cromozomului, centromerul fiind funcţional în timpul diviziunii cînd restul cromozomului este genetic inactiv. Centromerul este considerat locusul genelor pentru activitatea mitotică şi meiotică a cromozomului, avînd un ciclu al ADN-ului diferit de cel al restului cromozomului care este sintetic activ şi funcţional în stare difuză, decondensată a cromatinei interfazice. Centromerul este localizat la nivelul constricţiei primare a cromozomului. În cromozomul metafazic, dublu-cromatidic, la nivelul constricţiei primare se află patru granule numite cromomere centromerice, dispuse în pătrat (structură cvadripartită). În cromozomul anafazic (monocromatidic) se află doar două cromomere centromerice (structură bipartită). Cromomerele centromerice reprezintă zone specializate ale regiunii centrice pentru ataşarea fibrelor şi

(posibil) pentru sinteza fibrelor fusului de diviziune (organit implicat în separarea cromozomilor fii). Procesele robertsoniene de fisiune și fuziune centrică pot să se desfășoare fără pierdere sau cîștig de material, în regiunea centromerului, prin simpla trecere de la structura bipartită la structura cvadripartită (fuziune) sau de la structura cvadripartită la acea bipartită (fisiune). Microscopia electronică a demonstrat existența plăcilor cinetochore la care se atașează fibrele fusului de diviziune. Plăcile cinetochore ce aparțin la doi cromozomi telocentrici se pot uni spre a forma placa cinetochoră a cromozomului metacentric.

Tot ca o regiune distinctă de restul brațului cromozomului eucariotic apar și *telomerele,* diferite mai ales chimic decît morfologic de restul cromozomului. Funcția esențială a telomerelor este de a preveni unirea capetelor cromozomilor normali sau unirea acestora cu capetele fragmentate ale altor cromozomi, așa încît numai două capete rupte de cromozomi se pot uni în condițiile funcționării normale a telomerelor. Natura telomerelor este heterocromatică. Telomerele sînt de asemenea regiuni specializate ale cromozomilor în vederea atașării acestora la membrana nucleară.

Dimensiunea cromozomilor eucariotici este variabilă, de la fracțiuni de microni (0,25 μm lungime și aceeași grosime la unele ciuperci), aflați la limita de rezoluție a microscopului optic, pînă la ordinul zecilor de microni. Cei mai lungi (în afara celor politeni din glandele salivare de Diptere care, de fapt, nu sînt cromozomi „mitotici" ci „interfazici") se află la planta Trillium, avînd circa 30 μm lungime. Lungimea medie a cromozomilor eucariotici este de 5 μm.

Numărul cromozomilor la eucariote. La eucariote, numărul de cromozomi este foarte variabil fiind o caracteristică de specie. Cel mai mic număr de cromozomi la eucariote este 2 și se întîlnește la unele flagelate din genul Holomastigatoides, la anelidul polichet Ophryotrocha puerilis, numeroși rabdoceli (Mesostema și Phaenocora), toate speciile de Dalyella și insecte din tribul Icerini (White, 1954). Un caz aparte se întîlnește la viermele nematod Ascaris megalocephala (Parascaris equorum univalens), la care, în celulele liniei germinale (spermatogonii și ovogonii, celulele primordiale germinale) se află doar doi cromozomi ($2n = 2$; $n = 1$)) dar în celelalte celule somatice se află un număr mult mai mare de cromozomi rezultați din fragmentarea acestor doi cromozomi ai liniei germinale, care prezintă, pe lîngă alte caracteristici, și bucle laterale asemănătoare cromozomilor plumoși (Schreiber. G., 1973). Cel mai mare număr de cromozomi la animale a fost determinat la crabul Eupagurus ochatensis ($2n = 254$) și la fluturele spaniol Lysandra nivessens ($2n = 380$). La plante superioare, cel mai mic număr de cromozomi se află probabil la Haplopappus gracilis ($2n = 4$). Cel mai mare număr de cromozomi la plante și probabil într-un nucleu eucariotic este de $2n = 1260$ și este întîlnit la Ophyoglossaceae, anume la Ophyoglossum reticulatium. Numărul mare de cromozomi la acest grup este însoțit de o mare cantitate de ADN pe celulă. Astfel Price H. J. și col. (1972) au determinat la O. petiolatum, la care $2n = 1020$ cromozomi 170 ± 2 pg. ADN pe celulă comparativ cu cantitatea de 53 respectiv 58 pg/genom găsită la plante cu cromozomi mari precum Lilium și Tradescantia.

STRUCTURA MOLECULARĂ A CROMOZOMULUI EUCARIOTIC

Referitor la această problemă disputa se dă între concepția multifibrilară (multinemică) și cea monofibrilară (uninemică), fără a se putea decide cu certitudine în favoarea uneia sau alteia, deoarece datele moderne de analiză electronmicroscopică, denaturare-renaturare, liză și centrifugare etc., aduc dovezi contradictorii. Dar se pare că aceste date dau cîștig de cauză concepției uninemice care stă la baza modelului elaborat de Dupraw (1969, 1970), fiind în acord cu statutul pe care îl are ADN-ul de material ereditar, autoreplicativ. Cercetările din ultimii patru ani susțin acest model, arătînd că fiecare cromozom conține o moleculă dublu-catenară de ADN care ocupă toată lungimea sa, neexistînd ipoteticele legături (linkeri) proteice din modelele mai vechi propuse de Freese și Taylor. Dealtfel chiar Taylor (Taylor și col., 1973) arată că ADN-ul în cromozom apare potențial ca o dublă helice care în perioada de replicare, cînd cromozomii au cîte două subunități longitudinale de ADN cu polarități opuse, se separă și se conservă în cromozomii fii după modelul semiconservativ. Folosind metoda măsurării proprietăților vîscoelastice ale ADN-ului din cromozomii de Drosophila, Kavenoff și col. (1974) au arătat că asemenea polimeri lungi de ADN pot fi menținuți în soluție și măsurați ca atare. Concepția prezenței unei lungi macromolecule de ADN în cromozomul eucariotic este așadar conformă cu aceste date. Cromozomul eucariotic apare în imaginile electronmicroscopice cu o ultrastructură alcătuită din numeroase filamente foarte fine de 30 pînă la 350 sau 500Å diametru, filamente care formează o rețea vagă ce poate fi interpretată ca reprezentînd cromonema spirală. Este posibil ca o cromatidă metafazică să conțină două asemenea cromoneme sau numai una.

Modelele ipotetice privind ultrastructura cromozomului și structura sa moleculară nu au stabilit o legătură logică între aranjamentele ipotetice preconizate și structura cromatidei formată din nenu-

mărate filamente fine care apar în imaginile electronmicroscopice. La rîndul său modelul uninemic explică foarte greu multe aspecte remarcate în comportamentul și structura cromozomului. Așa bunăoară este fenomenul izomarcării remarcat în cercetările autoradiografice și vizibila „duplicitate" a cromozomului în anafază remarcată de multă vreme la unii cromozomi (vezi Nebel, 1941; Warmke, 1941) aceasta constituind argumente forte pentru concepția multinemică folosită de mulți cercetători moderni (H. Swift, 1974).

La nivel molecular înțelegerea structurii cromozomului se lasă greu dezvăluită. Concepția uninemică a cromatidelor metafazice are susținători numeroși. După Comings și Okada (1974) această concepție este în deplină concordanță cu fenomenele genetice de mutație, recombinare și replicare a materialului genetic, cu fenomenele de fragmentare cromozomală, renaturare a ADN-ului etc. După ei (1970 d) semicromatidele ar reprezenta o iluzie optică datorată spiralizării cromatidelor iar admiterea concepției multinemice este în dezacord cu datele analizei genetice. Dacă toate fibrele unei cromatide multinemice sînt genetic funcționale, atunci mutația punctiformă recesivă nu ar putea niciodată să fie exprimată fenotipic. Informația genetică este codificată în secvența de nucleotide din ADN. Dacă o mutație afectează o singură pereche de nucleotide această mutație ar afecta doar una din multiplele fibrile ale cromatidei multinemice. Celelalte ar funcționa normal și deci fenotipul mutant niciodată nu ar putea fi dezvăluit, lucru care nu se întîmplă în mod normal. Mai mult, concepția multinemică este în discordanță cu modelul semiconservativ de replicare, unanim acceptat și demonstrat. La nivelul cromozomului eucariotic nu există ipotetică axă proteică indicată de Taylor (1958) ori Stublefield&Wray (1971), lucru demonstrat de studiul electronmicroscopic al cromozomilor păsărilor și mamiferelor. În asemenea electronografii există doar fibre de cromatină, pliate în fel și chip. În electronografiile cromozomilor parțiali dispersați, fibrele superficiale emerg în bucle laterale, pe cînd fibrele centrale rămîn compacte dînd iluzia falsă a unei axe cromozomale (Comings și Okada, 1970 c), lucru demonstrat și la scanning-microscop (SEM). Dacă ar exista o axă centrală a cromozomului mitotic acest lucru ar trebui să se vadă în ultrasecțiuni așa după cum apare clar filamentul axial tripartit (complexul sinaptinemal) la nivelul cromozomilor meiotici conjugați.

În multe modele privind ultrastructura cromozomului eucariotic fibrele prezintă o orientare predominantă în lungul cromozomului ceea ce este în dezacord cu realizarea translocațiilor reciproce ca și cu corelația dintre hărțile genetice și hărțile citologice și cu recentele studii privind modelul de bandare a cromozomilor eucariotici

(Arrighi, F. E. & Hsu T. C. 1971) Lejeune, J., 1973, Caspersson T., 1973, Zech, L, 1973, Voiculescu I. și col. 1972 etc.).

Din experiențele de centrifugare și retardație vîscoelastică ale lui Kavanoff și col. (1974) reiese că există o singură moleculă de ADN per cromozom la drojdie și drosofilă. Fibrele de ADN pot adera ușor unele la altele, dînd falsa impresie a fibrelor intercromozomale preconizate de DuPraw (1970) căci ceea ce apare a fi interconexiuni cromozomale sînt de fapt bucle laterale ale fibrelor cromozomilor, bucle care se ating numai. Tipuri asemănătoare de interacțiuni aparente se remarcă și între cromatidele surori iar segregarea modelului de marcare în timpul mitozei arată clar că nu este vorba de conexiuni reale. Dacă ADN-ul unei celule ar exista ca o singură macromoleculă, circulară, așa cum afirmă DuPraw, atunci ar trebui să existe un aranjament precis al cromozomilor aflați în raporturi bine definite unii față de alții. Deși există unele date privind dispunerea preferențială a unor cromozomi în placa metafazică la periferia sau în centrul acesteia, ca și unele observații privind tendința spre împerecherea somatică a cromozomilor omologi, nu există încă dovada certă a faptului că aranjamentul spațial al cromozomilor nu este întîmplător.

Fibrele de cromatină se atașează la membrana nucleară în locuri precise (annuli), punctele de convergență ale acestor fibre persistînd chiar după separarea de membrană în timpul diviziunii și acestea se reatașează la membrana nucleară nou formată în telofază. Acesta este mecanismul prin care este menținut un aranjament de cutare constant al cromatinei atît în interfază cît și în metafază.

Modelul unei fibre continue de ADN, pliată de nenumărate ori în interiorul cromatidei, fiind continuă de la o telomeră la alta și interdigitînd cu fibra cromatidei surori în regiunea centromerului este, se pare, cel mai acceptat în momentul de față.

S-ar putea ca în cromozomii obișnuiți, asemănător situației de la cromozomii politeni sau plumoși, cromatida să aibă, în locul unei fibre lungi, pliată în fel și chip, o serie de bucle laterale apropiate care, prin întrepătrundere, să dea un aranjament reticulat așa cum apare în electronografii. Datele electronmicroscopice și citogenetice asupra structurii și funcției benzilor cromozomului politen arată că numai 10% din ADN-ul unei cromomere de mărime medie funcționează în codificarea unei molecule proteice de lungime medie, restul de 90% putînd fi pierdut prin deleție fără ca această pierdere să afecteze funcția normală a cromozomului (Sorsa et col. 1974). În momentul de față, puține lucruri se pot spune despre rolul „neesențial" a acestei părți majore a cromonemei cromozomului politen.

Este posibil ca acest ADN să conţină genele legate de represori, derepresori sau promotori, semnale pentru procesul de transcripţie etc.

O caracteristică de seamă a genomului eucariotelor, în contrast cu acela al procariotelor este înaltul grad de redundanţă al ADN-ului său. Circa 60% din ADN-ul eucariotelor superioare apare în secvenţe repetate de baze în sute de mii de copii (ADN-repetitiv). În experienţele de separare în gradient de densitate în clorură de cesiu, ADN-ul celular se separă în mai multe fracţiuni dintre care una este principală iar altele, reprezentînd 10—15% din ADN-ul celular, apar în benzi mai mici. ADN-ul acestor benzi mici s-a numit ADN satelit şi el poate fi mai greu sau mai uşor faţă de fracţiunea principală. S-a constatat că tocmai acest ADN satelit este înalt repetitiv (cuprinde adesea 10^6 copii ale unei singure secvenţe de 400 nucleotide pe set de cromozomi la şoarece). Pardue şi Gall (1970) au constatat că acest ADN satelit, la şoarece, este localizat în heterocromatina centromerică. De regulă ADN-ul satelit este localizat în heterocromatina constitutivă, dar poate fi şi „ADN-spacer" localizat între gene. Multe eucariote, după cum s-a arătat, poartă în genomul lor o cantitate apreciabilă de ADN, care aparent este lipsit de semnificaţie genetică. Există pe de altă parte un înalt grad de variabilitate moleculară a secvenţelor unice de nucleotide la specii foarte înrudite, dar o constanţă apreciabilă a cistronilor ribozomali. Variabilitatea reală la nivelul moleculei de ADN este în mod sigur mult mai mare datorită redundanţei codului genetic, prin care multe substituţii de baze nu prezintă nici un efect asupra secvenţei aminoacizilor în lanţul polipeptidic (Kimura, 1974).

O altă caracteristică a genomului eucariotic este fenomenul de amplificare genică prin care o parte din genom se replică diferenţiat, exemplul clasic fiind oferit de buclele laterale ale cromozomului plumos şi pufele cromozomului politen. Amplificarea genică apare ca urmare a activităţii unei transcriptaze inverse care iniţiază sinteza unui ADN-ribozomal. Amplificarea genică apare ca un caz particular de politenie adaptată la evenimentele genetice ale meiozei. (A. Lima-de-Faria, 1974). Înrudit cu fenomenul de amplificare genică este fenomenul de „magnificaţie", prin care creşte numărul cistronilor ribozomali în timpul profazei meiotice la o mutantă de Drosofila şi se realizează prin inserţia ADN-ului nou sintetizat în cromozomi printr-o combinaţie de crossing-overe diferenţiale, sau poate fi asociat cu un crossing-over meiotic inegal. ADN-ul eucariotic, în cadrul fibrilei nucleo-histonice este foarte compact, mai ales atunci cînd histona este bogată în arginină. Sinteza histonelor este strîns coordonată cu replicarea ADN-ului

Datele recente privind replicarea cromozomului arată că atunci cînd are loc sinteza replicativă de ADN, nucleotidele sînt încorporate în catene foarte scurte (de cca. 100 nucleotide) analoage fragmentelor lui Okazaki de la procariote (Huberman J. A. & H. Horwitz, 1974). Prezenţa în timpul replicării cromozomului a unor segmente relativ mici izolate, de circa 1,2 — 6,5 μm de ADN helical sugerează existenţa unor mici subunităţi de replicare. Unele din aceste segmente au circa 1200 nucleotide, altele pot avea 6.000 nucleotide. După Taylor (1973, 1974), la eucariotele evoluate o parte considerabilă din genom constă din segmente de ADN de circa 0,4 μm, fiecare dintre ele avînd la un capăt o secvenţă de nucleotide care serveşte ca loc de iniţiere pentru replicarea ADN-ului. Alte segmente sînt mai mari avînd circa 1,6 — 2,0 μm. În cromozom, la nivelul ADN-ului, secvenţe unice de circa 90 nucleotide sînt separate de secvenţe repetitive de circa 300 nucleotide. Autoradiografierea cromozomilor eucariotelor a evidenţiat existenţa unui număr mare de segmente care se replică simultan (Ris şi Kubai, 1970) din care cauză cromozomul eucariotic a fost considerat a fi alcătuit dintr-un număr mare de unităţi replicative aşezate în tandem, analoage repliconului procariotelor. Datele cele mai recente privind replicarea cromozomului eucariotelor (Hershey şi Taylor, 1974) arată că ADN-ul este replicat continuu sau pe regiuni mari pe o catenă şi pe segmente mici pe cealaltă catenă.

Este reactualizată ideea după care cromomerele pot funcţiona ca unităţi de replicare (ideea bazată pe observarea discontinuităţii replicării ADN-ului eucariotic) şi de expresie genică (transcripţie, mutaţie, recombinare). Dealtfel, pufele cromozomilor politeni şi buclele laterale ale cromozomilor plumoşi sînt considerate manifestări structurale ale activităţii genice derivate din cromomere specifice.

Replicarea semiconservativă a ADN-ului atît la procariote cît şi la eucariote face să se păstreze integritatea catenelor polinucleotidice iniţiale, complementaritatea şi ordinea bazelor azotate, aspecte cu profunde implicaţii în transmiterea fidelă a informaţiei ereditare. Complementaritatea reprezintă prin sine o proprietate a catenelor de ADN care asigură funcţionarea unui mecanism de replicare exactă a ADN-ului. Genomul eucariotelor conţine o cantitate mult mai mare de ADN comparativ cu genomul procariotelor, dar un număr considerabil de cistroni sînt redundanţi. Ca şi la procariote, replicarea este semiconservativă, dar realizată cu o viteză mult mai mică (circa 0,5—2 μm/minut), existînd numeroase puncte de iniţiere a replicării la nivelul fiecărui genofor (cromozom). În separarea genoforilor fii funcţionează un aparat special, aparatul mitotic. Meca-

nismele de recombinare genetică la procariote și eucariote sînt diferite și contrastante. Marea cantitate de ADN întîlnită la eucariote este însoțită de un reglaj genetic complex, realizat în timpul diferențierii celulare.

Folosind secvențele ARN-ribozomal 5S, Kimura și colab. (1974) au încercat să estimeze timpul la care eucariotele și procariotele au evoluat divergent. Distanța medie mutațională dintre eucariote (om, drojdie) și procariote (E. coli) este mai mare de 1,5 ori decît distanța dintre om și drojdie. Pe baza studiului comparativ al secvențelor pentru citocromul C s-a constatat că distanța mutațională dintre mamifere și drojdii este de 3 ori mai mare decît distanța dintre mamifere și pești care se știe că s-au separat acum 400 milioane de ani. Comparînd aceste date s-a ajuns la concluzia că divergența dintre eucariote și procariote a avut loc acum 1,8 bilioane de ani. Datele recente obținute la microscopie electronică și biochimie, sprijină ideea originii endosimbiotice a unor organite celulare din celula eucariotă (mitocondrii și cloroplaste) ca fiind inițial procariote libere (Margulis, 1970).

III. ORGANIZAREA GENETICĂ MEZOCARIOTĂ

Algele dinoflagelate prezintă o organizare genetică care este intermediară între aceea a procariotelor și organizarea genetică eucariotă. Datorită acestui fapt grupul de alge dinoflagelate a fost inclus într-un tip aparte de organizare genetică care s-a numit mezocariot. Organizarea genetică mezocariotă se caracterizează prin:

1. Materialul genetic organizat la nivelul unui nucleu propriuzis care prezintă membrană nucleară și nucleol mare (endozom) ca la eucariote.

2. ADN-ul este repartizat ca și la eucariote pe mai mulți cromozomi (genofori), al căror număr se înscrie între 4 și 275.

3. Structura fină a cromozomilor în imaginile electronmicroscopice este asemănătoare aceleia a nucleoidului bacterian (ADN-plasmei) și nu cu a cromozomului eucariotic, fiind reprezentată în esență de fibrilele de ADN de circa 25 Å diametru al căror aranjament la nivelul cromozomilor dinoflagelatelor conferă acestora un aspect bandat remarcat uneori și în nucleoidul bacterian.

4. Din punct de vedere biochimic la mezocariote ca și la procariote ADN-ul nu este combinat cu proteinele bazice histone. De asemenea, în cromozomii dinoflagelatelor libere nu s-a detectat prezența ARN-ului.

5. Cromozomii dinoflagelatelor nu suferă un ciclu de spiralizare, rămînînd cu formațiuni baghetiforme, discrete, identificabile pe parcursul întregului ciclu celular.

6. Sinteza ADN-ului este potențial continuă pe parcursul întregului ciclu celular ca la bacterii, nefiind limitată doar la o anumită perioadă (S) a ciclului celular ca la eucariote.

7. Segregarea cromozomilor fii nu implică un aparat mitotic ca la eucariote, distribuția acestora fiind mediată de membrana nucleară. Atașarea cromozomilor dinoflagelatelor la membrana nucleară prezintă frapante asemănări funcționale cu atașarea cromozomului bacterian la membrana celulară. Membrana nucleară este persistentă în timpul diviziunii nucleului.

Numărul mare de cromozomi la unele dinoflagelate sugerează politenia sau poliploidia. Unele date recente privind cinetica renaturării ADN-ului la dinoflagelatul Cryptecodinium cohnii, 56% din ADN este repetitiv — o caracteristică specifică eucariotelor evoluate, iar 44% reprezintă ADN cu secvențe unice de baze azotate. Cantitatea de ADN este foarte variabilă, de la 3,5 pg pe celulă la Cryptecodinium cohnii, la 200 pg pe celulă la Gonyaulax polyedra. Comparativ, setul haploid de cromozomi la om conține circa 2,7 pg ADN.

Cromozomii dinoflagelatelor sînt acentrici iar replicarea se realizează prin diviziune longitudinală — cromozomii prezentînd forme caracteristice de Y sau V, în funcție de stadiul procesului de replicare.

În ultimul timp s-a pus în evidență existența unei foarte mici cantități de proteină asociată cromozomilor izolați de dinoflagelate, dar proporții similare de proteină comparativ cu cantitatea de ADN se află și la bacterii. Tipică pentru eucariote însă este existența în cromatină a unor cantități aproximativ egale de histone și ADN. ADN-ul dinoflagelatelor poate conține o mică fracțiune de 5-metilcitozină și cantități mai mari de 5-hidroximetiluracil. Deși tipică pentru dinoflagelatele mezocariote este existența cromozomilor permanent condensați la formele libere, există în cadrul acestei organizări genetice mai multe tipuri de organizare nucleară. Astfel, se poate deosebi tipul nuclear în care cromozomii baghetiformi sînt condensați, numărînd de la 25 la 275, histonele fiind nedetectabile histochimic. Centriolii nu sînt implicați în procesul de mitoză. Nucleul este sferic (Cryptecodinium cohnii) sau în formă de potcoavă (Gonyaulax tamarensis). La alte specii există un nucleu mare vegetativ cu cromozomi necondensați, și un nucleu mic cu cromozomi condensați în stadiul de spor mobil (Noctiluca, Diplomorpha). Unele specii au un număr mic de cromozomi (4—6), care au formă

de „V" (Merodinium, Syndinium, Atlanticellodinium). La asemenea specii au fost detectate histochimic proteine bazice (în speţă la Syndinium — un dinoflagelat parazit) iar centriolii sînt implicaţi în mitoză.

Reprezentanţii clasei Ellobiophyceae şi genul Haplazoon prezintă de asemenea cromozomi necondensaţi în nucleul celulelor vegetative. Interesant este şi faptul că la unele specii de dinoflagelate se constată existenţa concomitentă (în aceeaşi celulă) a două tipuri de nuclei, unul cu organizare genetică mezocariotă iar altul cu organizare genetică eucariotă, ceea ce complică şi mai mult această bizară organizare genetică.

* * *

Evoluţia organizării genetice în lumea vie porneşte de la existenţa materialului genetic neseparat de procesele fundamentale structurale şi funcţionale ale celulei (procariote) şi ajunge la organizarea unui spaţiu genetic delimitat printr-o membrană de restul citoplasmei-nucleul. Această evoluţie este însoţită de organizarea cromozomilor diferenţiaţi structural şi funcţional, adică purtători de informaţie genetică diferită ceea ce duce la organizarea informaţiei genetice în mai multe grupe de linkaj, egal cu numărul perechilor de cromozomi omologi la organismele diploide tipice. Structura acestor cromozomi este menţinută prin asocierea ADN-ului cu proteine bazice histone care determină şi existenţa unui ciclu de condensare şi decondensare a cromatinei, neîntîlnit la procariote. De asemenea la eucariote se diferenţiază regiuni heterocromatice care cuprind de regulă secvenţe repetate de nucleotide, care se replică tardiv, fiind mult mai condensate în comparaţie cu regiunile eucromatice.

Evoluţia materialului genetic de la procariote la eucariote cuprinde şi apariţia unor segmente discrete de ADN cu secvenţe repetate de baze azotate, prezente la eucariote, nedetectate încă la procariote. Separarea produşilor de replicare este înlesnită la eucariote de aparatul mitotic. Apariţia acestuia corespunde cu specializarea unei regiuni cromozomice — cu rol în ataşarea la fibrele fusului de diviziune-centromerul. Totodată, la eucariote, sinteza replicativă a ADN-ului este restrînsă doar la o anumită perioadă (S) a ciclului celular.

Genoforii procariotelor şi cromozomii (genoforii) eucariotelor reprezintă extremele unui continuu evolutiv, între care apare ca intermediar organizarea genetică, mezocariotă a algelor dinoflagelate. Dar la baza tuturor acestor organizări genetice stau cele două proprietăţi de bază ale materialului genetic: reproducerea exactă (autoreplicare) şi reglarea strictă a proceselor vitale.